

Aus dem Zentrum für Klinische Chemie, Immunologie u. Human-
genetik der Justus Liebig-Universität Giessen

Gf.Direktor: Prof. Dr. med. L. Röka

DAS ENZYM BETA-PROPIOLAKTONHYDROLASE:
SUBSTRATE UND VORKOMMEN IM SERUM BEI
GESUNDEN UND KRANKEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Bereiches Humanmedizin
der Justus Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von
WOLFGANG BECKER
aus

Allmendfeld

Giessen 1974

Aus dem Zentrum für Klinische Chemie, Immunologie u. Human-
genetik der Justus Liebig-Universität Giessen
Gf.Direktor: Prof. Dr. med. L. Róka

DAS ENZYM BETA-PROPIOLAKTONHYDROLASE:
SUBSTRATE UND VORKOMMEN IM SERUM BEI
GESUNDEN UND KRANKEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Bereiches Humanmedizin
der Justus Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von
WOLFGANG BECKER
aus

Allmendorf

Giessen 1974

Dekan: Professor Dr. med. D. Ringled

Referent: Professor Dr. med. L.Róka

Korreferent: Professor Dr. G. Gundlach



I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

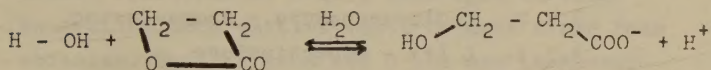
	Seite
Einleitung	1
Methode	3
1. Versuchsanordnung	3
2. apparativer Aufbau	3
3. Umrechnung auf intern. Enzymeinheiten	6
4. Prüfung der Methode	7
5. Beschreibung der Standardmethode	9
Hauptteil I : Prüfung der Hydrolyse von Lactonen	10
durch das Enzym nach dessen Anreicherung	
1. Anreicherung des Enzyms	10
2. der Ansatz zur Messung der Lactonhydrolyse	10
3. Untersuchung der einzelnen Lactone	12
3.1. Cumarin	12
3.2. D - Glucuronsäure - Gamma - Lacton	13
3.3. L + Ascorbinsäure	16
3.4. Marcumar	17
3.5. 4 - D - Galactonolacton	18
3.6. D - Gluconolacton	20
3.7. Kavain	21
4. Diskussion	22
Hauptteil II : Prüfung der Enzymaktivitäten in	24
einem Kollektiv von Gesunden	
1. graphische Auftragung der Messergebnisse	25
2. Aufschlüsselung nach Alter und Geschlecht	26
3. Diskussion	29
Hauptteil III : Prüfung der Enzymaktivitäten in	30
den Seren mehrerer Gruppen Kranker	
1. Auswertungsschema der Messergebnisse	30
2. Darstellung der einzelnen Krankengruppen	34

2.1. Harnstoff	34
2.2. Cholesterin	35
2.3. Gesamtbilirubin	36
2.4. Triglyceride	37
2.5. GPT	38
2.6. Gamma - GT	39
3. Synopsis der Krankengruppen nach prozentualer Häufigkeit	40
4. statistische Auswertung	42
4.1. Vergleich von arithm. Mittelwert, Varianz und Standardabweichung	43
4.2. Varianzanalyse	43
5. Diskussion	45
Zusammenfassung	46
Literaturverzeichnis	

E I N L E I T U N G

1.) Über β -Propiolacton ist bisher bekannt:

Es wird in wässrigem Milieu spontan hydrolysiert und zerfällt dabei nach folgender Gleichung:



Formel 1:

Dabei entsteht unter Freiwerden eines Protons die β -Propionsäure. Im Humanserum verläuft die Hydrolyse rascher als im Wasser. Die Ursache dafür konnte von G. Rossow (7) auf das Vorhandensein eines β -Propiolacton spaltenden Enzyms zurückgeführt werden.

2.) Bisher nicht bekannt sind die für die Charakterisierung des Enzyms notwendigen Daten wie:

- 2.1. das physiologische Substrat
- 2.2. die Spezifität
- 2.3. ob es mit einem anderen Enzym identisch ist
- 2.4. die Bildungs- und Wirkorte des Enzyms
- 2.5. seine Aktivität bei Gesunden
- 2.6. ob die Aktivitäten bei bestimmten Erkrankungen verändert sind
- 2.7. wenn ja, welche Veränderungen bei welchen Erkrankungen bestehen

3.) Aufgabenstellung

- 3.1. Ich prüfte mehrere Lactone als Substrate, um nähere Aussagen über die Spezifität des Enzyms machen zu können.
- 3.2. ... die Enzymaktivitäten in einem Kollektiv von Gesunden
- 3.3. ... die Enzymaktivitäten bei mehreren Gruppen von Kranken

4.) Weg zur Lösung der Aufgabe

4.1. Als mögliche Substrate für das Enzym wurden folgende Lactone auf ihre Hydrolyse in Gegenwart des Enzyms hin untersucht:

- 4.1.1. Cumarin
- 4.1.2. D-Glucuronsäure - Gamma-Lacton
- 4.1.3. L (+) - Ascorbinsäure
- 4.1.4. Marcumar
- 4.1.5. 4 -D- Galactonolacton
- 4.1.6. D - Gluconolacton
- 4.1.7. Kavain

4.2. Ein Kollektiv von 18 Seren von Gesunden, die keine pathologischen Werte aufwiesen, wurde auf ihre Aktivität bezüglich der β -Propylactonhydrolase hin untersucht.

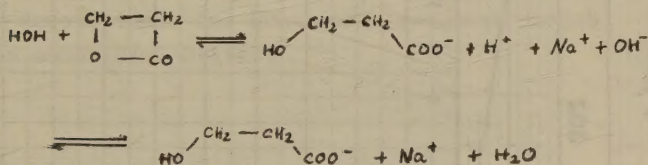
4.3. Gemessen wurden Seren von Kranken mit pathologischem Gehalt an:

- 4.3.1. Harnstoff - 38 Seren
- 4.3.2. Cholesterin - 34 Seren
- 4.3.3. Gesamtbilirubin - 34 Seren
- 4.3.4. Triglyceride - 14 Seren
- 4.3.5. G P T - 57 Seren
- 4.3.6. Gamma-G T - 54 Seren

M E T H O D E

1.) Versuchsanordnung

Das bei der Hydrolyse von 1 Molekül Beta-Propiolacton freiwerdende Proton läßt sich in einer Neutralisationsreaktion von 1 Molekül einer Base abfangen. Dadurch kann auf Grund des Laugenverbrauchs quantitativ auf Ausmaß und Geschwindigkeit der Hydrolyse geschlossen werden.



Formel 2:

2.) apparativer Aufbau

Die Neutralisationsreaktion fand im Titriergefäß des pH - Statens ¹⁾ statt. Die fortlaufende Messung des pH - Wertes erfolgte mit einer Glas- und einer Kalomelelektrode. Der pH - Stat war mit einem Registriergerät ²⁾ gekoppelt, das die Messung graphisch aufzeigte. Folgende Kurven und die dazugehörige Tabelle sollen das Prinzip veranschaulichen: (Abb. 1)

1,2 = Radiometer Kopenhagen

Verbrauchte Menge in $\text{NaOH} \times 20 \cdot 10^{-6} \text{ Mole (OH}^-)$

Spontanhydrolyse

300

000 l

302

1-000 l

318

Zeit in Minuten

319

335

Aktivität in U/ml

Messdauer : 10 Minuten 1 cm = 2 Minuten

Längenverbrecher : 1 Teilstrich = $20 \mu\text{l InNaOH}$
 $= 20 \cdot 10^{-6} \text{ Mole (OH}^-)$

Spontan-
aktivität

300 302 318 319 335

Tabelle 1:

Probe	μl 1 n NaOH in 10 min	minus Spontanhydrolyse = 30 μl 1 n NaOH/10'	U ^x
Spontan	30	--	3
300	175	145	14,5
302	100	70	7
318	250	220	22
319	120	90	9
335	400	370	37

^x Da pro Ansatz immer 1ml Humanserum genommen wurden,
kann es auch 1U/ml heißen.

Die erste Kurve links oben der Abbildung 1 gibt die Spontanhydrolyse von 20 Mikroliter Beta-Propiolacton in Wasser wieder. Die übrigen Kurven entsprechen der Hydrolyse nach Zusatz von je 1 ml frischem Humanserum zum Grundansatz.

Die Laufgeschwindigkeit des Registrierpapiers betrug 1 cm / 2 min. Dadurch erstreckt sich die Kurve über eine Zeitdauer von 10 Minuten. Ein Quadrat des Papiers von 1 cm Kantenlänge ($= 1 \text{ cm}^2$ Fläche) ist in 5 Abschnitte von je 0,2 cm = 2 mm unterteilt. Diese Strecke entspricht der Menge von 20 Mikroliter in NaOH. Ein Verbrauch von 1 mal 10^{-6} Mole (OH^-) / min entspricht einer Enzymmenge von 1 U. Bei allen Messungen wurde die Spontanhydrolyse von Beta-Propiolacton in Wasser der Hydrolyse in Humanserum gegenübergestellt. Die sich aus den beiden unterschiedlichen Werten ergebende Differenz wurde als die Aktivität des Enzyms angenommen.

Es gilt also:

SERUMHYDROLYSE

- SPONTANHYDROLYSE

= ENZYMAKTIVITÄT

In der Tabelle 1 bezeichnet die linke Spalte die Labornummer des gemessenen Serums bzw. den Leitwert mit Wasser. Die nächste Spalte gibt den jeweils gemessenen NaOH Verbrauch pro Minute wieder, wie er aus der Steigung der jeweiligen Kurve resul-

tiert. Davon muß man, um die Enzymaktivität zu erhalten, den NaOH - Verbrauch bei Spontanhydrolyse in Wasser abziehen (nächste Spalte). Der Wert in der Spalte ganz rechts gibt dann die berechnete Enzymaktivität in U (Units) an.

3.) Umrechnung auf Enzymeinheiten

Da sich die Enzymaktivität zunächst in verbrauchten Mikrolitern in NaOH in 10 min ausdrückt, ergibt sich die Notwendigkeit, diese in internationale Enzymeinheiten (U) umzurechnen.

$$3.1. \quad 1 \text{ U} = \frac{10^{-6} \text{ Mole Substrat}}{\text{min}}$$

Die normale NaOH stellt in unserem Falle das Äquivalent für das Substrat dar.

3.2. n Mikroliter in NaOH entspricht

$$n \cdot 10^{-6} \text{ Mole NaOH}$$

also ist

$$\frac{n}{10} : 10^{-6} \text{ NaOH die pro}$$

Minute verbrauchte Substratmenge

Da sich die Enzymaktivität in 1 ml Serum pro Ansatz befindet, errechnet sich aus der in 10 min verbrauchten Menge in NaOH in Mikrolitern (= n) die Enzymaktivität nach der Formel:

3.3. n · (Mikroliter in NaOH in 10 min) =

$$\frac{n}{10} \text{ U/ml}$$

bezogen auf 1 ml Serum pro Ansatz

Daraus resultiert, daß der zehnte Teil der in 10 min verbrauchten Mikroliter in NaOH einer internationalen Enzymeinheit (U) pro ml Serum entspricht.

4.) Prüfung der Methode

4.1. Eine Versuchsreihe sollte klären, ob die pro Zeiteinheit verbrauchte NaOH - Menge der eingesetzten Enzymmenge proportional ist. Alle Versuche dieser Reihe fanden bei Zimmertemperatur (20 - 22° C) und mit der konstanten Menge von 20 Mikroliter Beta-Propiolacton statt. Die Dauer der Messung betrug jeweils 10 Minuten. Der pH-Wert betrug 7,5 . Als Humanserum wurde ein frisches Sammelserum benutzt.

Tabelle 2:

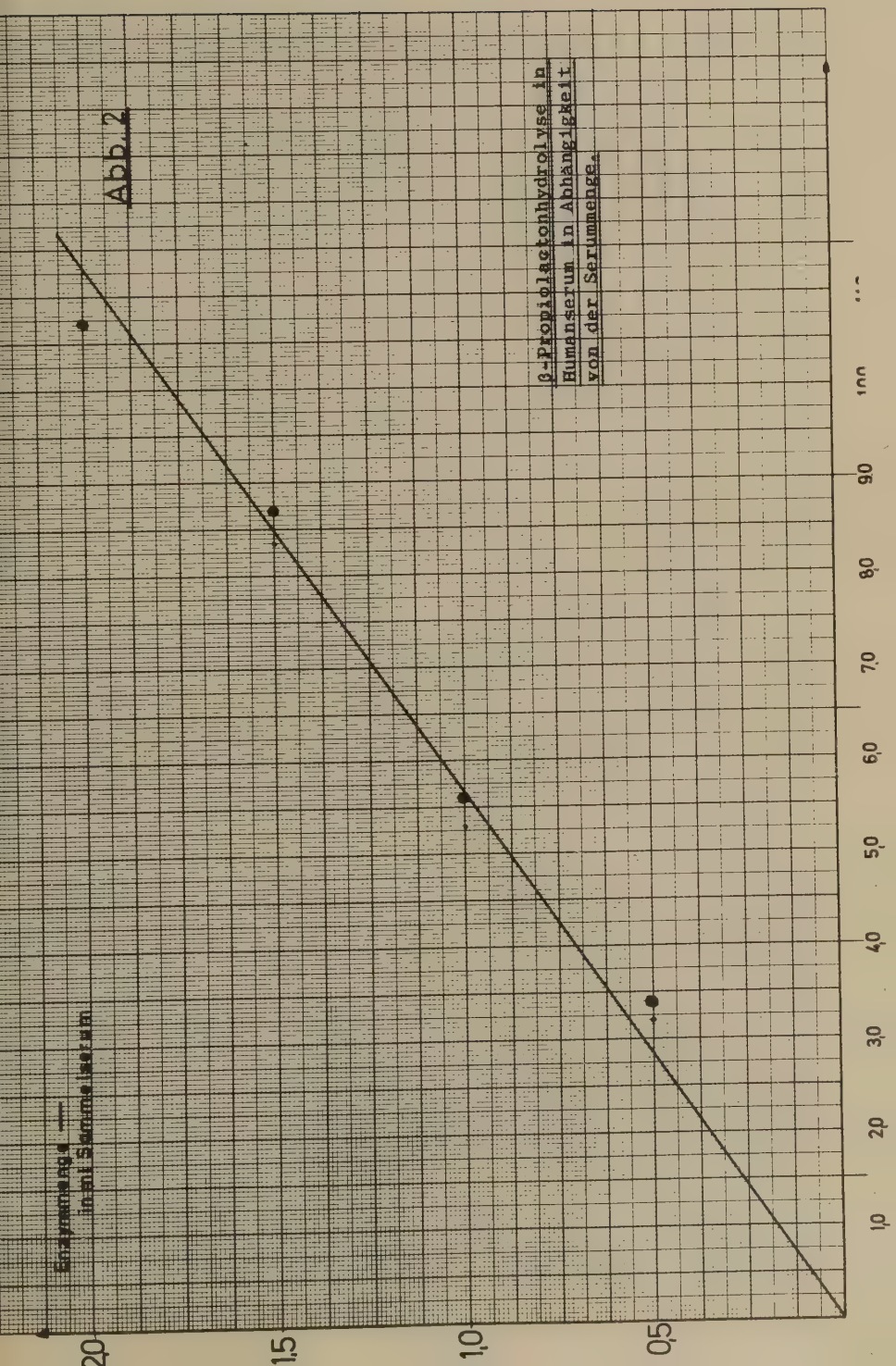
Serum ml	Beta-PL ul	H ₂ O ml	Zeit min.	Aktivität (U)
0,5	20	6,5	10	3,4
1,0	20	6,0	10	5,6
1,5	20	5,5	10	8,7
2,0	20	5,0	10	10,7

Trägt man die Aktivitäten (U) der Tabelle 2 gegen die eingesetzte Serummenge ein, erhält man eine Gerade (Abb. 2).

Enzymmenge —
in ml Serum

Abb. 2

β -Propionlactonhydrolyse in
Humenserum in Abhängigkeit
von der Serummenge.



- 4.2. Eine zweite Versuchsreihe sollte den optimalen pH-Wert für das weitere Arbeiten erbringen. Dazu ist eine möglichst große Differenz zwischen Spontanhydrolyse von Beta-Propiolacton in Wasser und der Hydrolyse in Humanserum wünschenswert. Es geht also um die Ermittlung des pH-Optimums des Beta-Propiolactonspaltenden Enzyms. Auch die Versuche dieser Reihe laufen bei Zimmertemperatur ($20 - 22^{\circ} \text{C}$). Es wurde jeweils 1 ml eines frischen Sammelserums benutzt. Die Messdauer betrug 10 Minuten.

Tabelle 3:

Serum ml	pH-Wert	H ₂ O ml	Zeit min.	Aktivität U
1,0	7,0	6	10	2,5
1,0	7,5	6	10	3,75
1,0	8,0	6	10	0,7
1,0	8,5	6	10	0,8

Aus den Werten für die Aktivität (U) ergibt sich folgendes graphisches Bild: (Abb. 3)

- 4.3. Um die Frage nach dem Temperaturoptimum zu klären, wurden zwei vergleichende Messungen gemacht. Bei 10 Minuten Messdauer und einem pH-Wert von 7,5 wurde jeweils 1 ml frisches Sammelserum benutzt.

Add. 3

pH - Optimum der
3-Propionylacetylhydrolase

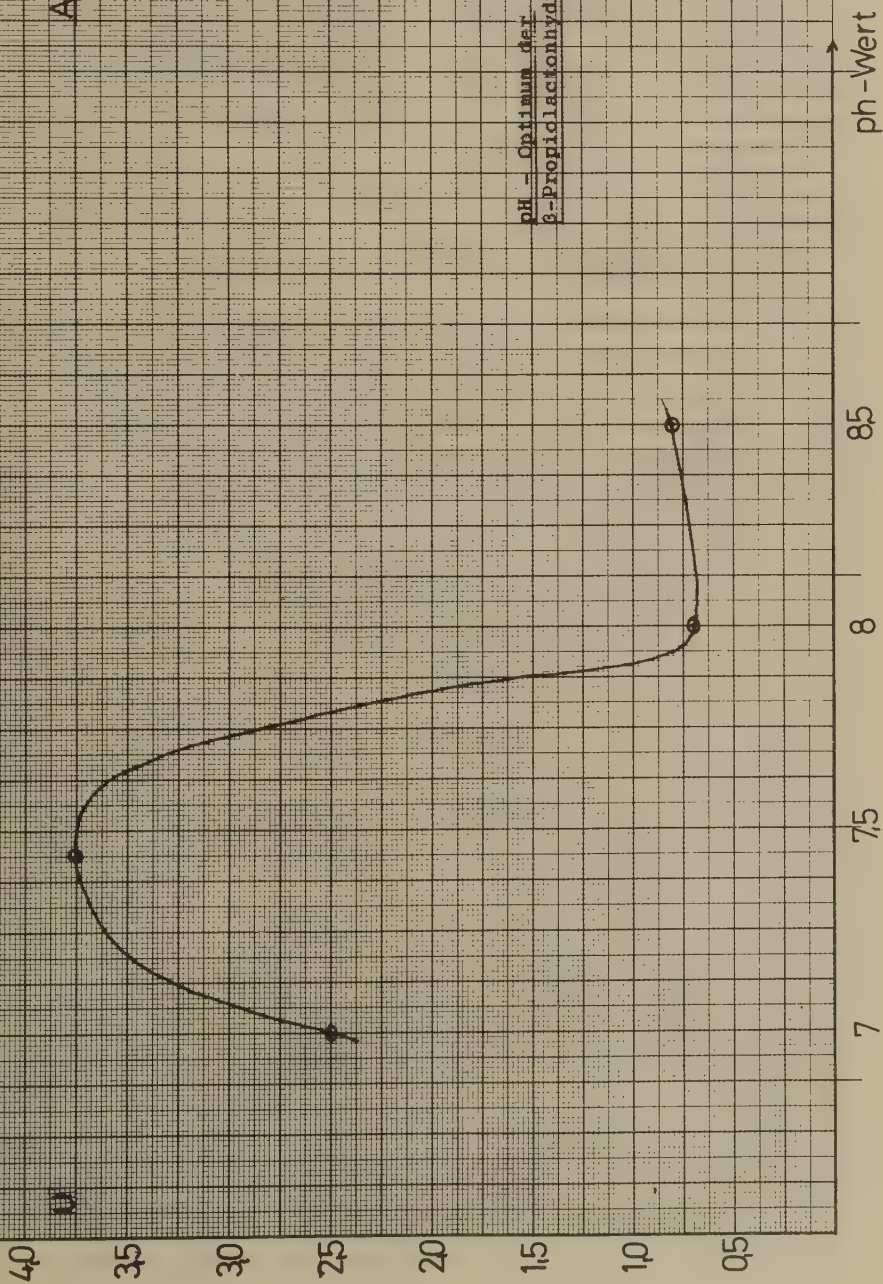


Tabelle 4:

Serum ml	ph-Wert	H ₂ O ml	Temperatur °C	Aktivität U
1	7,5	6	Zimmertemperg. (20 - 22°)	8,0
1	7,5	6	37°	9,3

4.) Standardmethode

Da Beta-Propiolacton bereits im Wasser spontan hydrolysiert, ist für die Bestimmung der Enzymaktivität nicht das optimale Milieu allein maßgebend, sondern die Bedingung, unter der der Unterschied zwischen Spontan- und Serumhydrolyse am deutlichsten in Erscheinung tritt.

5.1. Danach ergibt sich als Standardmethode:

- 5.1.1. Serummenge: 1 ml
- 5.1.2. zugesetzte Menge an dest. Wasser: 6 ml
- 5.1.3. pH-Wert: 7,5
- 5.1.4. Temperatur: 20 - 22° C = Zimmertemperatur
- 5.1.5. Meßdauer: 10 Minuten
- 5.1.6. Beta-Propiolactonmenge: 20 Mikroliter
- 5.1.7. Lauge: 1n NaOH
- 5.1.8. Registrierpapierlaufgeschwindigkeit:
1 cm / 2 Minuten
- 5.1.9. Aktivitätsmessung:
1 cm = 100 Mikroliter (1n NaOH)

Abb. 4

Tab. 5

ml Adsorbat

1,0
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200

U

Adsorbat (ml)

0,0

0,1

0,2

0,4

0,6

0,8

1,0

Aktivität (U)

4,5

3,0

4,4

8,5

10,6

13,1

15,4

Ansatz: 6 ml dest. Wasser, pH 7,5, Zimmertemperatur. Angegebene Menge Adsorbat mit 20 μ l Beta-Propiolacton 10' suspendiert. Die Aktivität (U) errechnet sich aus dem Verbrauch an 1 n NaOH minus dem Spontanhydrolyse.

H A U P T T E I L I

Prüfung der Hydrolyse von Lactonen durch das Enzym nach dessen Anreicherung

1.) Herstellung des Enzymkonzentrats

Um ein Konzentrat des Beta-Propiolacton spaltenden Enzyms zu erhalten, wurde folgender Weg beschritten (G. Rossow (7)):

1.1. 0,5 g kolloidale Kieselsäure / Aerosil wurden mit 200 ml frischem Sammelserum versetzt und für 24 Stunden bei Zimmertemperatur auf einem Magnetrührer gerührt. Dann wurde abzentrifugiert und der Niederschlag mit je 20 ml physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, bis er eiweißfrei war. Der Rückstand wurde dann in 20 ml physiologische Kochsalzlösung bei pH 7,5 suspendiert.

1.2. Tabelle 5 und Abbildung 4 zeigen, daß die Aktivität der Enzymmenge annähernd proportional ist.

2.) Ansätze zur Messung der verschiedenen Substrate

Jedes der 6 verschiedenen Lactone wurde bei mehreren pH-Werten gemessen, um eventuell für jedes Substrat verschiedene pH-Optima zu erfassen.

Es wurden folgende Standardbedingungen eingehalten:

Adsorbatmenge: 100 Mikroliter

Temperatur: 20° - 22° C = Zimmertemperatur

Zeit (Meßdauer: 6 min

Menge an aqua dest.: 6 ml

- 2.1. In einem ersten Ansatz wurde das pH-Optimum der Hydrolyse von 20 Mikroliter Beta-Propiolacton mit 100 Mikroliter Adsorbat untersucht.

Tabelle 6 zeigt, daß das pH-Optimum bei pH 7,5 liegt.

Tabelle 6:

Die Differenz in der rechten Spalte zeigt den tatsächlichen Aktivitätswert für das Adsorbat in U an, der nach Abzug der Spontanhydrolyse von der gemessenen Enzymaktivität resultiert (Abb. 5).

pH-Wert	Spontanhydrolyse	Adsorbathydrolyse	Differenz
	U	U	U
6	0,4	0,4	0
6,5	0,5	0,8	0,3
7	1,0	2,7	1,7
7,5	3,4	8,1	4,8
8	1,9	2,8	0,9
8,5	1,8	1,9	0,1
9	1,2	2,0	0,6

Abb. 5

BETA - PROPIOLACTON

U

10
9,0
8,0
7,0
6,0
5,0
4,0
3,0
2,0
1,0

ph

9

8,5

8

7,5

7

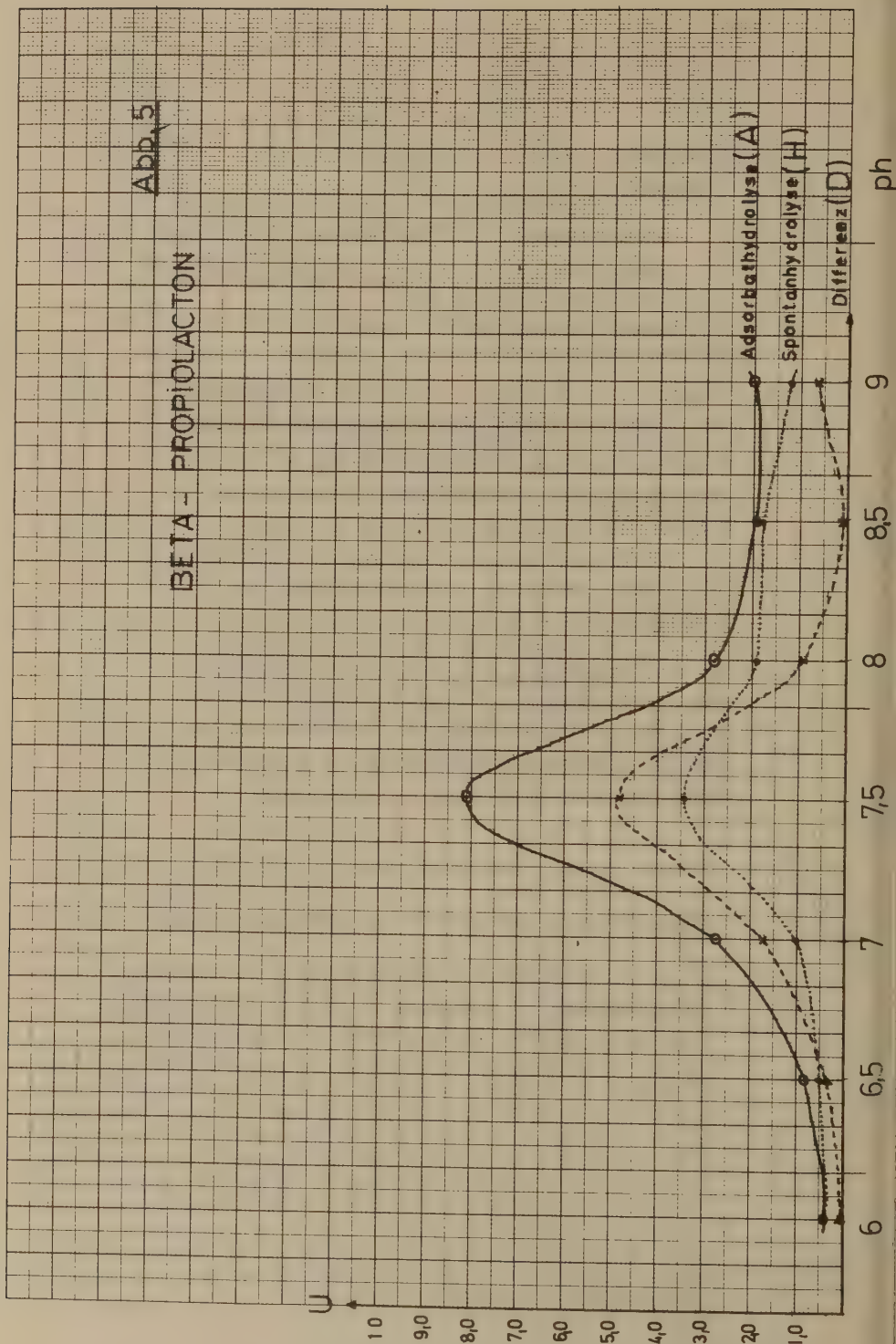
6,5

6

Adsorbtion (A)

Spontanhydrolyse (H)

Differenz (D)



3.) Die ermittelten Substratspezifitäten

Die folgenden Lactone wurden alle nach der Standardmethode (siehe 2.) untersucht. Spontanhydrolyse, Adsorbathydrolyse und deren Differenz sind in den folgenden Tabellen und zugehörigen Graphiken dargestellt.

3.1. Spontanhydrolyse und Enzymhydrolyse von 1 ml einer 0,1 molaren CUMARIN-Lösung.

Formel 3:

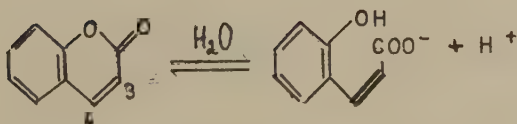


Tabelle 7:

pH-Wert	Spontanhydrolyse	Adsorbathydrolyse	Differenz
	U	U	U
6	5,1	0,5	- 4,6
6,5	4,4	0,7	- 3,7
7	4,6	1,9	- 2,7
7,5	4,3	5,8	1,5
8	4,0	7,0	3,0
8,5	4,3	6,2	1,9
9	4,4	6,0	1 6

Abb. 6

CUMARIN

U

Adsorbathydrolyse (A)

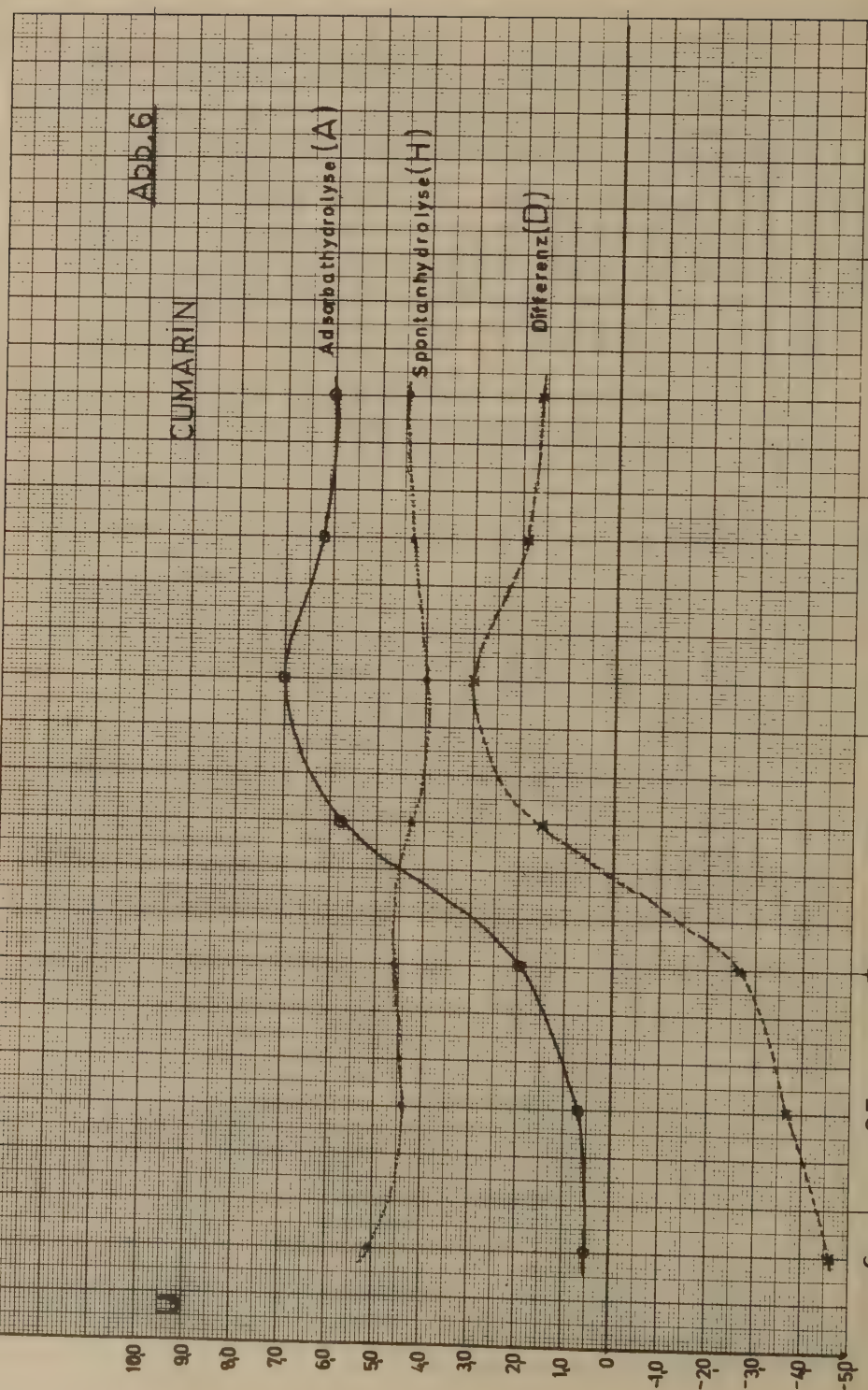
Spontanhydrolyse (H)

Differenz (D)

100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
-20
-30
-40
-50

6 6,5 7 7,5 8 8,5 9 9,5

ph



Während die Spontanhydrolyse nahezu pH-unabhängig ist, zeigt die Enzymhydrolyse ein pH-Optimum bei 8. Von pH 6 bis 7 liegt die Hydrolysegeschwindigkeit der enzymatischen Hydrolyse unter der der Spontanhydrolyse. Bevor auf eine enzymatische Hemmung der Hydrolyse im sauren Bereich geschlossen werden darf, müßte noch das Verhalten von Kieselensäure / Aerosil SiO_2 allein untersucht werden. Werden die spontan abgespaltenen Protonen gebunden bzw. gepuffert?

Diese Fragestellung wurde von mir experimentell nicht untersucht und bedarf noch weiterer Abklärung.

3.2. Spontanhydrolyse und Enzymhydrolyse von 1 ml einer 0,1 n Lösung von D-GLUCURONSÄURE - GAMMA - LACTON

Formel 4:

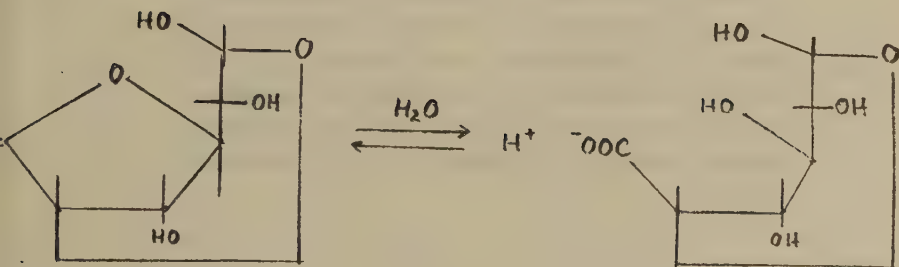


Tabelle 8:

pH-Wert	Spontanhydrolyse U	Adsorbathydrolyse U	Differenz U
6	1,0	0,1	- 0,9
6,5	0,4	2,7	- 2,3
7	1,2	5,5	4,3
7,5	2,7	7,9	5,2
8	4,5	9,5	5,0
8,5	7,9	11,0	3,1
9	9,0	12,8	3,8
9,5	10,3	12,1	1,8

Die Spontanhydrolyse steigt mit dem pH-Wert an mit einem Maximum bei pH 9,5. Die Enzymhydrolyse liegt bei pH 6 unter der Geschwindigkeit der Spontanhydrolyse. Ihr pH-Optimum liegt bei pH 7,5.

Es sind bereits Enzyme bekannt, welche D-Glucuronsäure-Gamma-Lacton umbauen. So beschreibt Mano (9) eine NADP - L - Hexonatdehydrogenase, welche L - Hexonsäurelactone oxidiert und d - Glucuronolacton in L - Gulonolacton umbaut. Eine D - Glucuronolactonase aus Rattenleberextrakt wurde von Eisenberg u. Field beschrieben (3).

ul-Hassan u. Lehninger fanden eine spezifische L - Gulonolactonase in Rattenleberextrakten (4).

Eine lösliche Lactonase, die Kawada fand, ist mit der Gluconolactonase identisch. Diese katalysiert die Hydrolyse von Gluconolacton 6 - Phosphat (10).

Winkelmann und Lehninger beschrieben eine mikrosomale Lactonase, die für D - Glucuronolacton spezifisch ist (5).

Ein pH-Optimum der genannten Enzyme war in der von mir durchgesehenen Literatur nicht angegeben.

Die Graphik gibt die in Tabelle 8 angegebenen Meßwerte wieder (Abb. 7).

140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
-20

Abb. 7

U D-GLUCURONSAURE - GAMMA -

LACTON

Adsorbathydrolyse (A)

Spontanhydrolyse (H)

Differenz (D)

ph

9,5

9

8,5

8

7,5

7

6,5

6

3.3. Spontanhydrolyse und Enzymhydrolyse von
1 ml einer 0,1 m L + ASCORBINSÄURELÖSUNG

Formel 5:

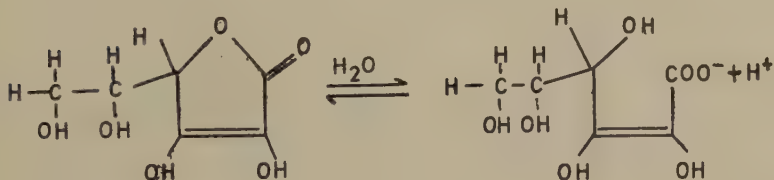
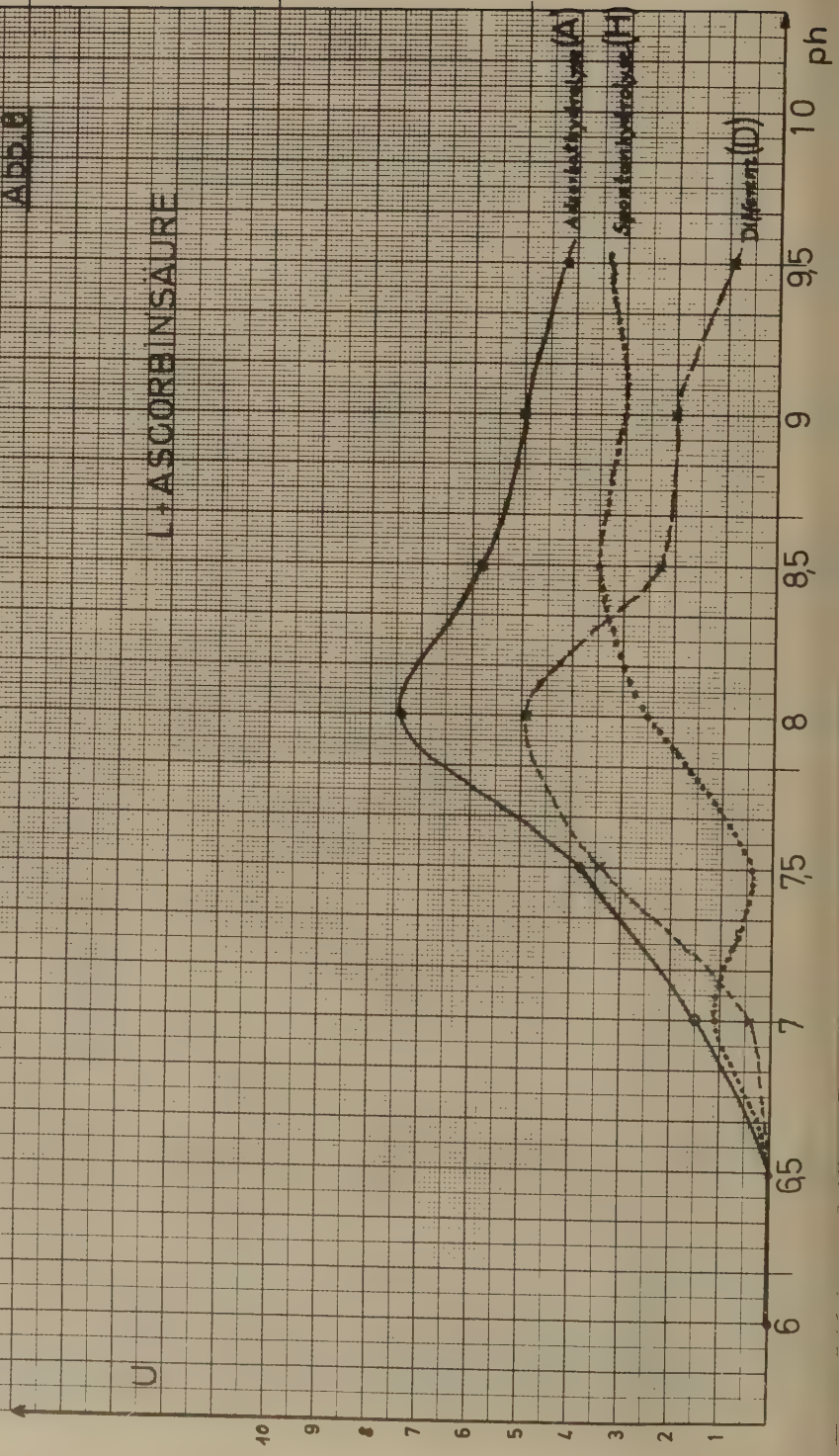


Tabelle 9:

pH-Wert	Spontanhydrolyse U	Adsorbathydrolyse U	Differenz U
6	0	0	0
6,5	0	0	0
7	1,1	1,5	0,4
7,5	0,4	3,8	3,4
8	2,5	7,4	4,9
8,5	3,5	5,8	2,3
9	3,0	5,0	2,0
9,5	3,3	4,2	0,9

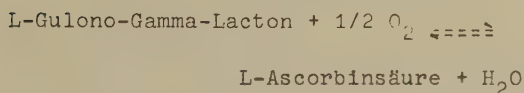
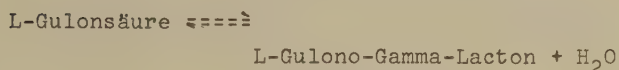
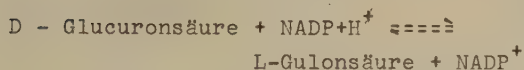
Abb. 8

L-ASCORBINSÄURE



Die Kurven von Spontanhydrolyse und Enzymhydrolyse haben ein Maximum bei pH 8,5 bzw. 8.

Ascorbinsäure kann im Organismus auf metabolischem Wege gebildet werden. Dabei stellt D - Glucuronsäure das Ausgangssubstrat dar.



Die Ascorbinsäure ist chemisch das Lacton der 2 - Keto - L - Gulonsäure. Eine spezifische Ascorbinsäurehydrolase konnte ich in der mir zur Verfügung stehenden Literatur nicht finden.

3.4. Spontanhydrolyse und Enzymhydrolyse von 1 ml MARCUMAR + Solvens

Formel 6:

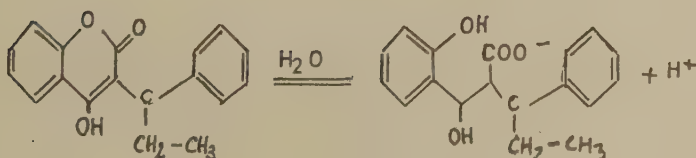


Tabelle 10:

pH-Wert	Spontanhydrolyse	Adsorbathydrolyse	Differenz
	U	U	U
6	0	0,3	0,3
6,5	0,1	0,6	0,5
7	0,3	0	- 0,3
7,5	0	0	0
8	0	0	0
8,5	0	0	0
9	0	0	0
9,5	0	0	0

Aus der Tabelle wird ersichtlich, daß Marcumar keine wesentliche Spontanhydrolyse zeigt. Auch bei Zusatz von Adsorbat findet keine meßbare Hydrolyse statt. Die zwischen pH 6 und pH 7 gemessenen Werte liegen so niedrig, daß daraus keine verwertbaren Schlüsse gezogen werden können.

3.5. Spontanhydrolyse und Enzymhydrolyse von
1 ml einer 0,1 m Lösung von
4 - D - GALACTONOLACTON

Formel 7:

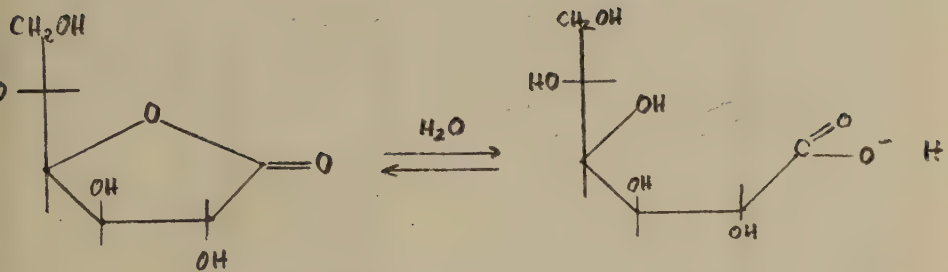
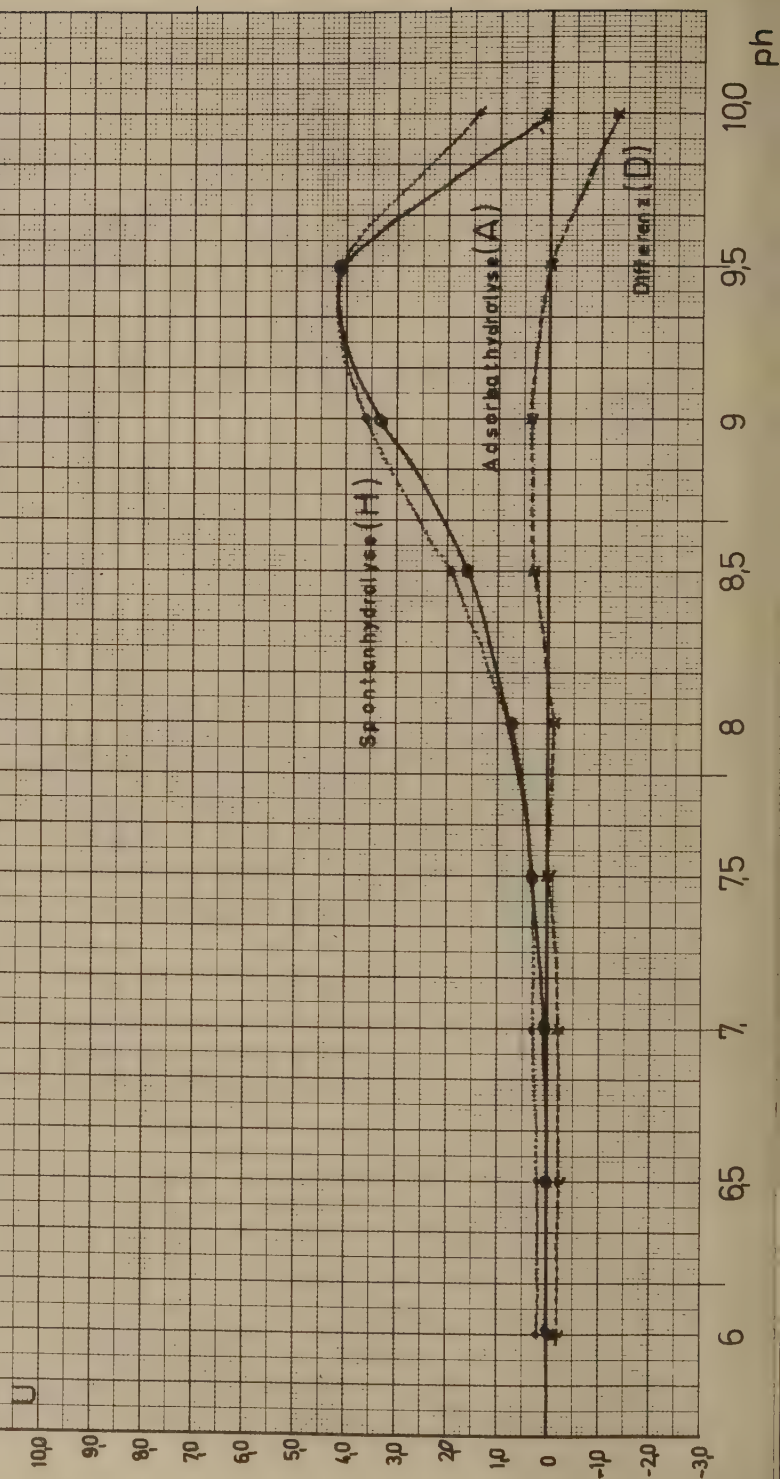


Tabelle 11:

ph-Wert	Spontanhydrolyse	Absorbathydrolyse	Differenz
	U	U	U
6	0,2	0	- 0,2
6,5	0,2	0	- 0,2
7	0,3	0,1	- 0,2
7,5	0,3	0,3	0
8	0,8	0,7	- 0,1
8,5	1,6	1,9	0,3
9	3,3	3,6	0,3
9,5	4,1	4,1	0
10	1,4	0,1	- 1,3

Abb. 9
4-D-GALACTONOLACTON



Das Substrat hydrolysiert spontan bei alkalischem pH-Wert mit einem Optimum bei pH 9,5. Ein Zusatz von Adsorbat ändert nichts an der Hydrolysegeschwindigkeit. Die von Eisenberg und Field beschriebene D-Glucuronolactonase (3) katalysiert auch die Hydrolyse von 4 - D - Galactonolacton (siehe 3.2) (Abb. 9).

3.6. Spontanhydrolyse und Enzymhydrolyse von 1 ml einer 1 m D - GLUCONOLACTONLÖSUNG

Formel 8:

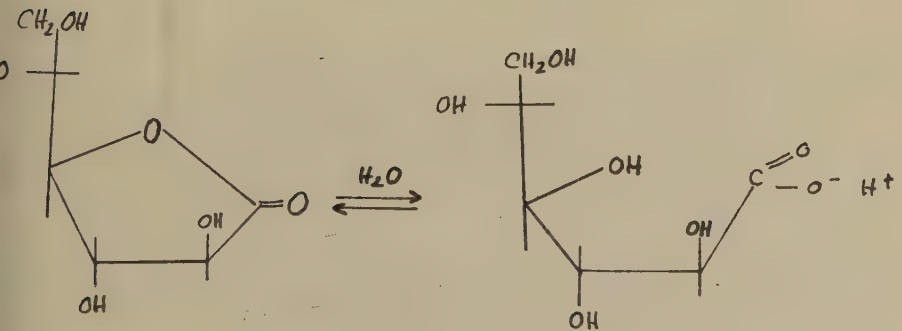


Abb. 10

D - GLUCIDOLYSE

U

Adsorbathydrolyse (A)

Spontanhydrolyse (H)

Differenz (D)

6 6,5 7 7,5 8 8,5 9 9,5 10

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100

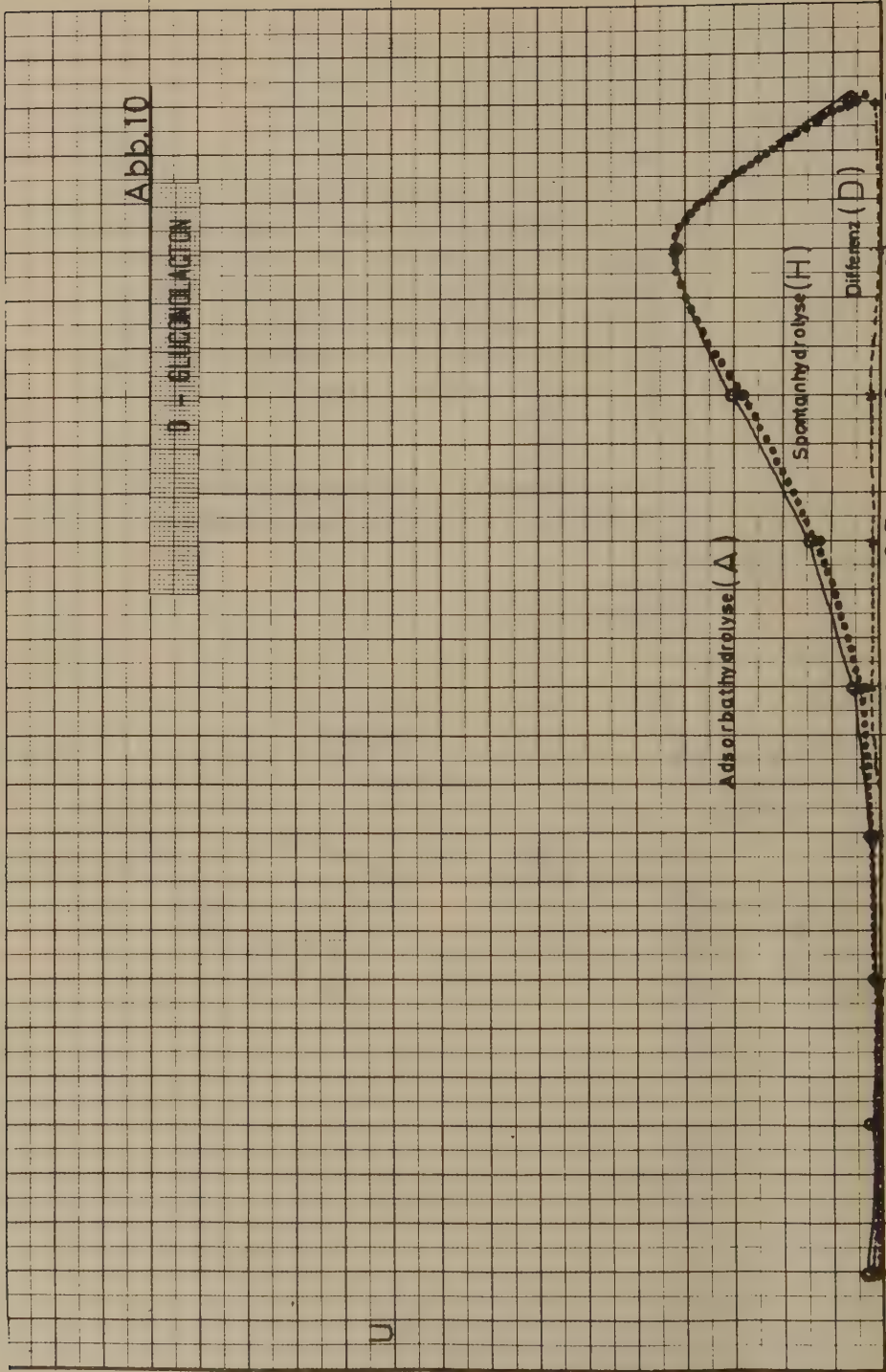


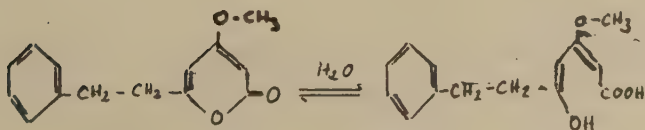
Tabelle 12:

pH-Wert	Spontanhydrolyse U	Adsorbathydrolyse U	Differenz U
6	0	0,2	0,2
6,5	0	0,1	0,1
7	0,1	0,1	0
7,5	0,2	0,2	0
8	0,4	0,6	0,2
8,5	1,3	1,4	0,1
9	2,8	3,0	0,2
9,5	4,2	4,2	0
10	0,5	0,6	0,1

Die Kurven von Spontan- und Enzymhydrolyse decken sich. Es liegt keine enzymatische Steigerung der Hydrolyse vor. Das pH - Optimum der Spontanhydrolyse liegt bei pH 9,5.

3.7. Spontanhydrolyse und Enzymhydrolyse von 1 ml (20 mg) einer 2% D,L - KAVAINLÖSUNG in Polystyrol

Im getesteten pH-Bereich von 6 - 9 fanden sich weder eine Spontanhydrolyse noch eine enzymatische Hydrolyse.



4.) Diskussion

Die 8 untersuchten Lactone lassen wesentliche Unterschiede von Spontan- und wenn vorhanden, Enzymhydrolyse erkennen. Folgende Tabelle ordnet die Lactone nach ihrer Hydrolysierbarkeit durch die Beta-Propiolactonhydrolase.

Tabelle 13:

Substrat	Aktivität U/ml	pH-Optimum
D - Glucuronsäure - Gamma - Lacton	5,2	7,5
L - Ascorbinsäure	4,9	8,0
Beta - Propiolacton	4,8	7,5
Cumarin	4,6	6,0
Marcumar	0,5	6,5
D - Galactonolacton	0,3	8,5 - 9,0
D - Gluconolacton	0,2	6,0-8,0-9,0
Kavain	0,0	-, -

Bei den ersten 4 Lactonen in der Tabelle liegt eine eindeutige enzymatische Katalyse der Hydrolyse vor. Die gefundenen pH-Optima der Hydrolyse liegen in dem Bereich von pH 6 - 8. Eine bevorzugte Hydrolyse von 5 - oder 6 - gliedrigen Ringstrukturen liegt nicht vor.

Bei der Frage nach dem physiologischen Substrat des Enzyms drängt sich die Ascorbinsäure in den Vordergrund. Für das D - Glucuronsäure - Gamma - Lacton sind bereits mehrere Hydrolasen beschrieben worden (siehe 3.2.). Cumarin und Beta - Propiolacton sind keine physiologischen Substanzen. Von Interesse erscheint die Beobachtung einer möglichen Hemmung der Cumarinhydrolyse durch Anaerosil (SiO_2) adsorbiertes Enzym im pH-Bereich von 6 - 7.

4 - D - Galactonolacton wurde durch das von mir verwendete Adsorbat nicht hydrolysiert. Die von Eisenberg und Field (3) aus Rattenleber extrahierte D - Glucuronolactonase katalysiert die Spaltung des Lactons (siehe 3.2.).

Die pharmazeutisch angewandten Substanzen Marcumar und Kavain wurden nicht hydrolysiert.

H A U P T T E I L II

Prüfung der Enzymaktivitäten in einem Kollektiv von Gesunden

Um die Aktivität des β - Propiolacton spaltenden Enzyms im Serum von Gesunden zu untersuchen, wurde ein Kollektiv von 18 Personen herangezogen, in deren Seren folgende Werte im Bereich der Norm lagen.

Tabelle 14:

Normalwerte	
Harnstoff	10 - 45 mg%
GPT	2 - 12 mU/ml (25 C)
Gamma - GT	3 - 25 mU/ml (25 C)
Gesamtbilirubin	0 - 1 mg%
Cholesterin	120 - 260 mg%
Triglyceride	80 - 200 mg%

Die Messungen wurden nach der oben beschriebenen Standardmethode durchgeführt. Die Angabe der Enzymaktivitäten erfolgt in Units (U).

Bewertung der Meßergebnisse:

- 1.) Das Gesamtkollektiv wurde in Gruppen verschiedener Serumaktivitäten unterteilt. Dazu folgende graphische Darstellungen: (Abb. 11, 12)

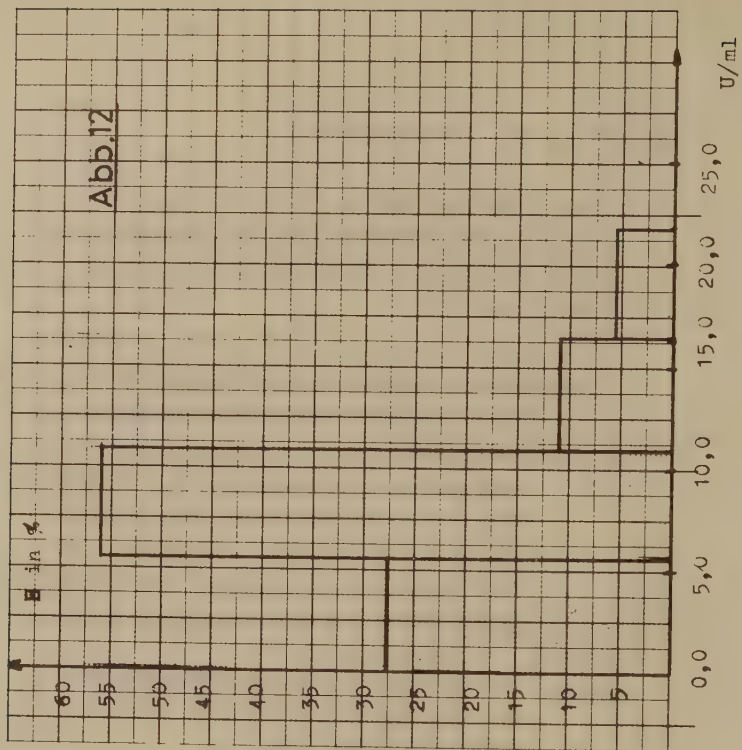
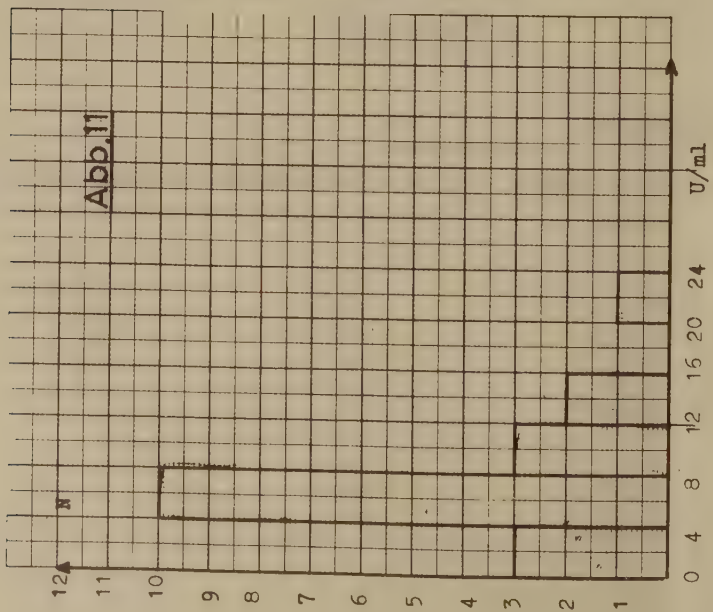
1.1. Auf der Abszisse der Abbildung 11 sind die Aktivitäten des Enzyms aufgetragen. Die Unterteilung wurde in konstanten Abständen von 4 U getroffen. Die Ordinate zeigt die Anzahl (N) der erhaltenen Meßergebnisse. Hier erscheint die Anzahl der gefundenen Werte für die einzelnen Gruppen.

Die Darstellung zeigt eine Anhäufung der Meßergebnisse für die Aktivitäten zwischen 5 und 8 U.

- 1.2. In der Abbildung 12 wurden größeren Aktivitätsgruppen ihre Häufigkeiten in % zugeordnet.

Tabelle 15:

Aktivitätsgruppe U/ml	Anzahl der Meßwerte N	Häufigkeit
0 - 5,4	5	27,8 %
5,5 - 10,9	10	56,0 %
11,0 - 16,4	2	11,1 %
16,5 - 21,8	1	5,6 %



Die Graphik gibt die Aktivität auf der Abszisse, die prozentuale Häufigkeit auf der Ordinaten wieder.

Die meisten Enzymaktivitäten liegen in der Gruppe von 5,5 - 10,9 U. Das Aussehen dieser Verteilung deutet auf eine logarithmische Normalverteilung hin.

- 3.) Aufschlüsselung des Personenkollektives nach Alter und Geschlecht. Dazu die Mittelwerte und deren Streuungen.

3.1. Berechnung

- 3.1.1 Der arithmetische Mittelwert $\bar{x}$ der gefundenen Enzymaktivitäten errechnete sich nach der Formel:

Formel 9:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

- 3.1.2 Man erhält den Wert für die Streuung (Standardabweichung) s nach:

Formel 10:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

3.2. Folgende Tabelle gibt die gefundenen Werte an:

Tabelle 16:

	$\bar{x}$	s
Aktivität in mU/ml	7,642	4,645
Alter in Jahren	48,05	13,7

Auf der Abbildung 13 sind die arithmetischen Mittelwerte ($\bar{x}$) in ihrer Lage mit gestrichelten Geraden markiert. Die Werte für die Streuungen (s) sind als durchgezogene Linien dargestellt. Die einzelnen Punkte mit den Nummern kennzeichnen die einzelnen Patienten in dem gewählten Koordinatensystem.

Abb. 13

Alter in

Jahren

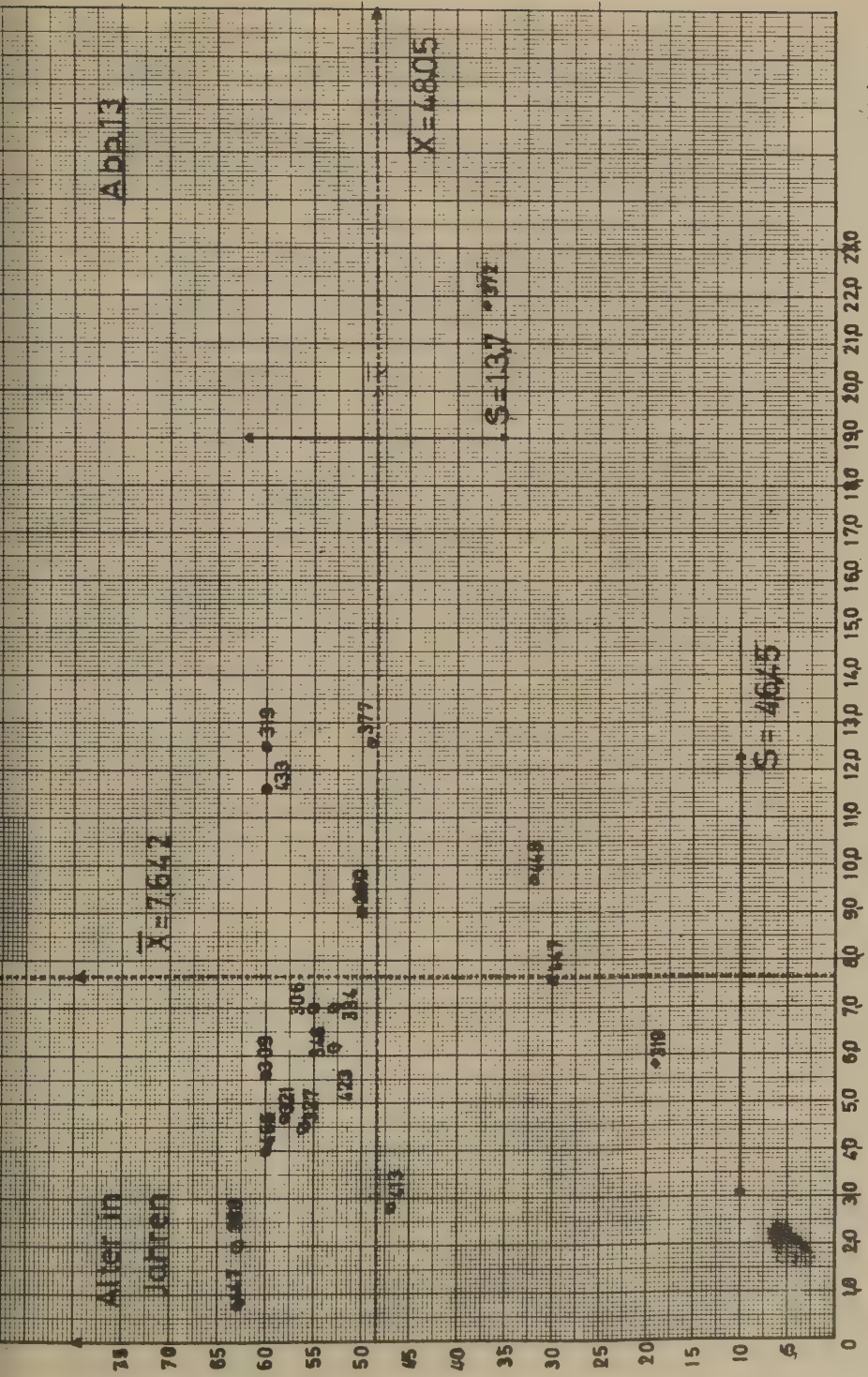
$\bar{x} = 76,42$

$\bar{x} = 180,5$

$s = 13,7$

$s = 46,5$

U/ml



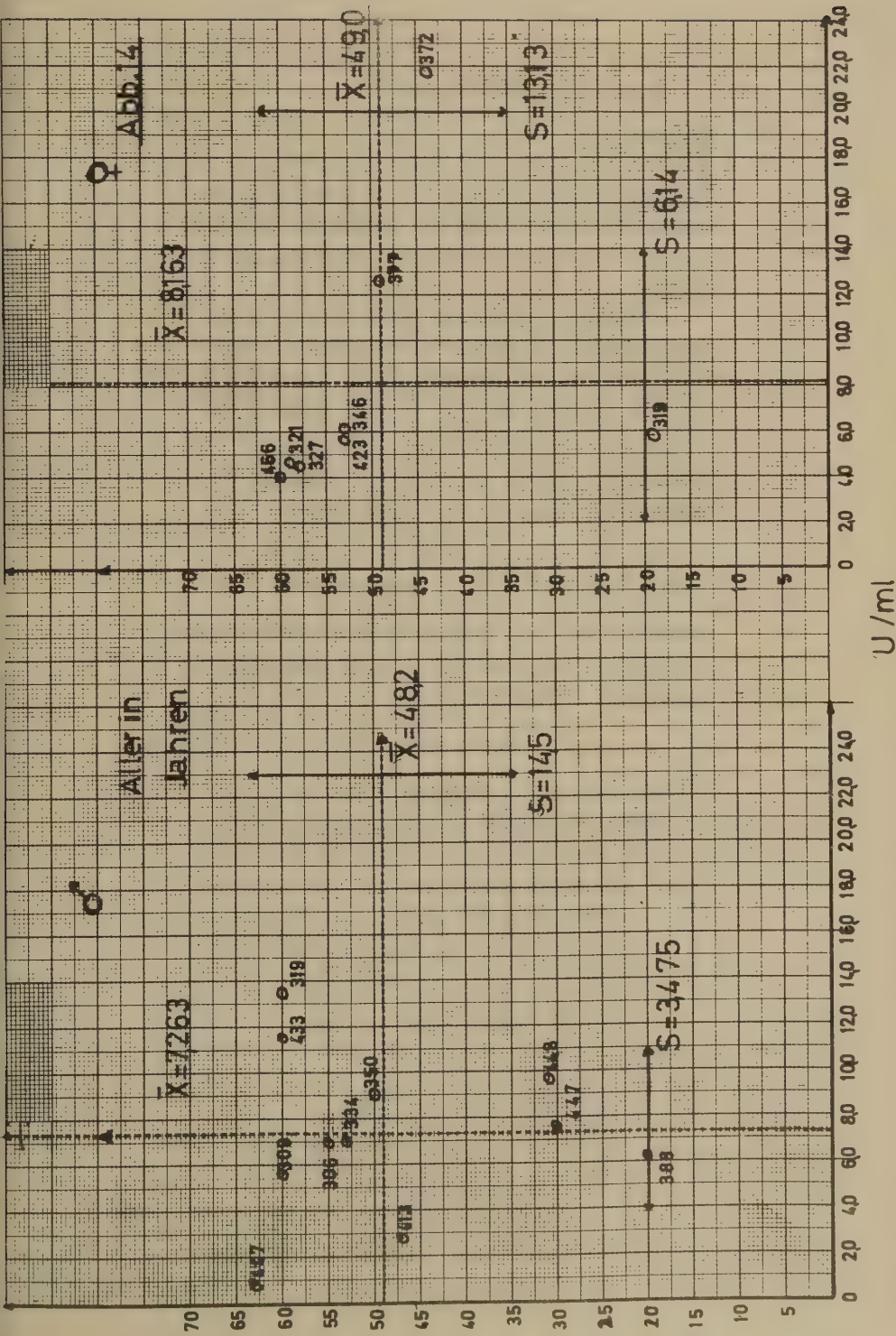
3.3. Es folgte die Unterteilung des Kollektivs von 18 Personen in 10 männliche und 8 weibliche.

Für beide Gruppen wurden analog der obigen Anordnung wiederum der arithmetische Mittelwert und die Streuung für Enzymaktivität und Alter getrennt berechnet.

Tabelle 17:

	männlich		weiblich	
	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
Aktivität	7,3	3,4	8,2	6,1
Alter	48,2	14,5	49,0	13,13

Die in der Tabelle enthaltenen Ergebnisse wurden graphisch nebeneinander dargestellt. Die Frauen erscheinen rechts, die Männer links (Abb. 14).

 $\mu\text{g}/\text{ml}$

4.) Diskussion

Zur Auswertung der gefundenen Meßergebnisse wurde ein "t" - Test für unpaarige Stichproben gemacht. Dabei ergaben sich folgende t-Werte:

Tabelle 18:

	t - Wert
Aktivitäten in U	0,40
Alter in Jahren	0,22

Daraus folgt, daß innerhalb der Gesamtgruppe keine Aktivitätsunterschiede des Enzyms bei Frauen und Männern bestehen.

H A U P T T E I L III

Prüfung der Enzymaktivitäten bei mehreren Gruppen von Kranken

- 1.) Bei 6 Patientengruppen wurde die Aktivität der Beta-Propiolactonhydrolase im Serum gemessen. Diese Gruppen besaßen pathologisch erhöhte Serumwerte für folgende Substanzen:

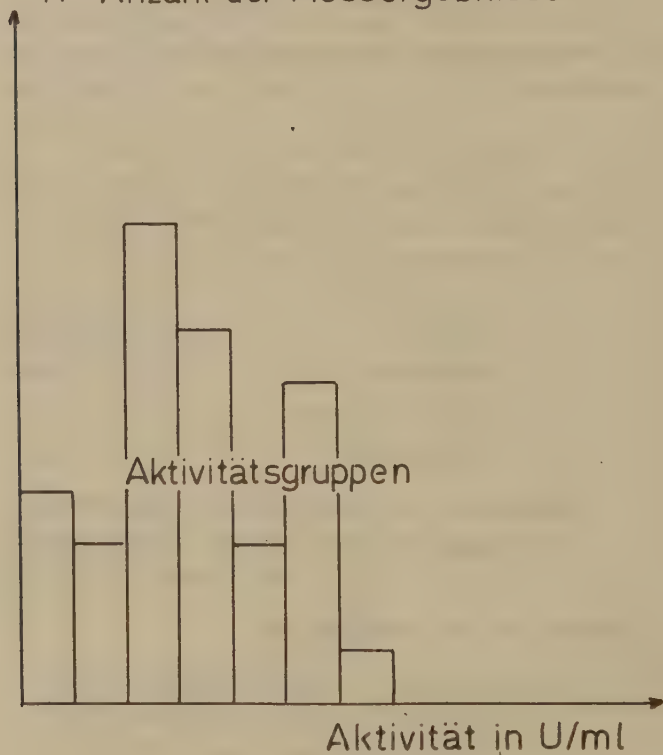
1.1. Harnstoff	- 38 Seren
1.2. Cholesterin	- 34 Seren
1.3. Gesamtbilirubin	- 34 Seren
1.4. Triglyceride	- 14 Seren
1.5. GPT	- 57 Seren
1.6. Gamma - GT	- 53 Seren

2.) Auswertung der Meßergebnisse

- 2.1. Für jedes der 6 Krankenkollektive wurde eine Unterteilung der gefundenen Enzymaktivitäten in Gruppen von 1 U/ml vorgenommen. Auf der Ordinaten erscheint als N die Zahl der erhaltenen Meßwerte (Abb. 15).

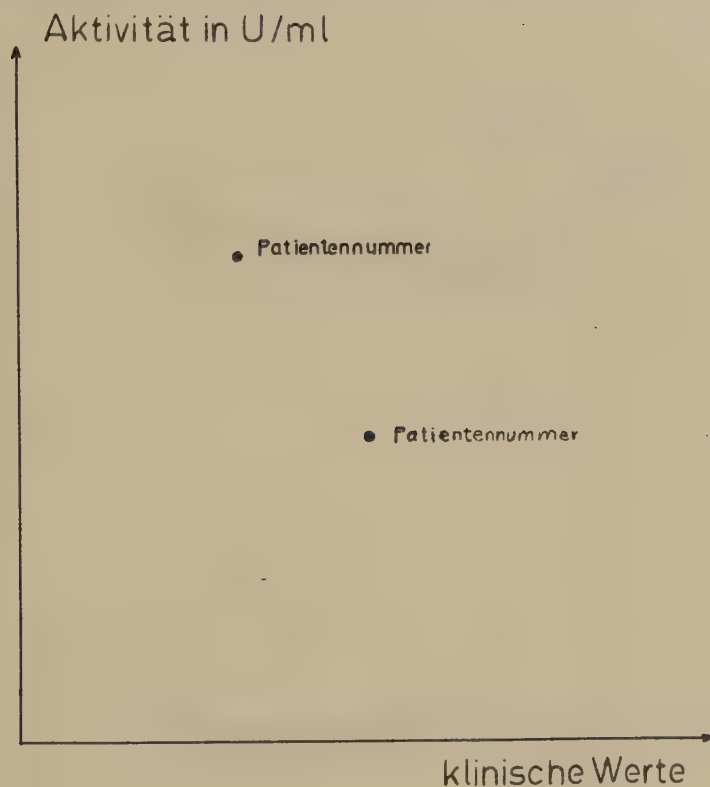
Abbildung 15: - Beispiel -

N = Anzahl der Messergebnisse



2.2. Eine zweite Darstellung ordnet die einzelnen Patienten mit der zugehörigen Labornummer in einem Koordinatensystem ein, dessen Abszisse den pathologisch erhöhten Leitwert und dessen Ordinate die pathologisch erhöhten Beta-Propionlactonhydrolaseaktivitäten in U/ml angeben (Abb. 16).

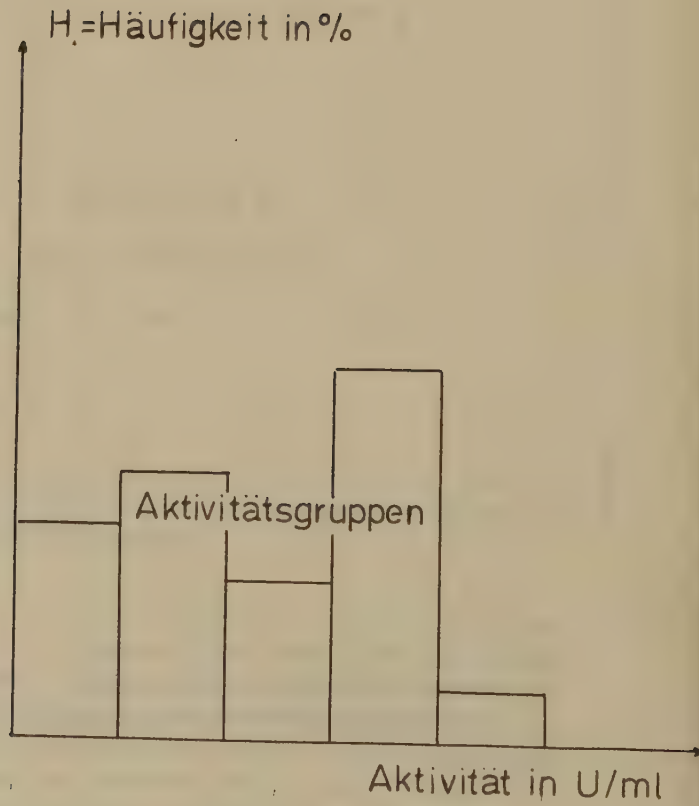
Abbildung 16: - Beispiel -



2.3. Eine dritte Darstellungsform gibt die prozentuale Häufigkeit für einzelne Aktivitätsgruppen an. Die Häufigkeit (H) ist auf der Ordinaten aufgetragen (Abb. 17).

Abbildung 17:

- Beispiel -



3.) Darstellung der einzelnen Krankengruppen

3.1. Harnstoff (Abb. 18, 19, 20)

3.1.1. Normalwerte: 10 - 45 mg %

3.1.2. Werte der Proben: 47 - 468 mg %

3.1.3. gefundene Enzymaktivitäten:

1,1 - 11,3 U/ml Serum

Abb. 18

HARNSTOFF

N

10

9

8

7

6

5

4

3

2

1

10

20

30

40

50

60

70

80

90

100

110

120

130

1100

U/ml

mg% Harnstoff

0.379

0.701

0.757

0.430

0.454

0.409

0.319

0.503

0.336

0.432

0.430

0.302

0.381

0.374

0.316

0.316

0.341

0.444

0.454

0.307

0.527

0.355

0.371

0.226

0.384

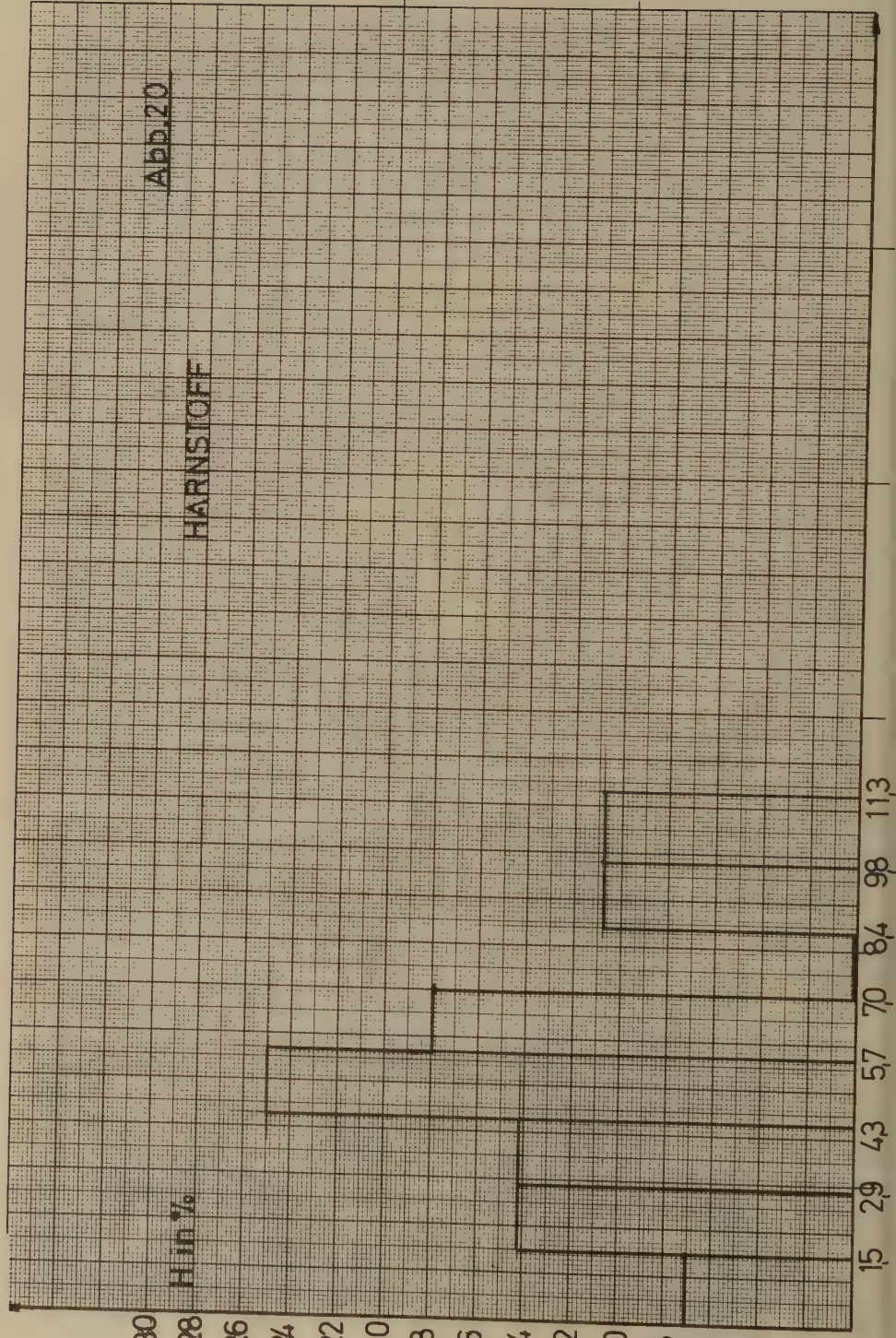
Abb. 20

HARNSTOFF

H in %

30
28
26
24
22
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2

15 29 43 57 70 84 98 113



3.2. Cholesterin (Abb. 21, 22, 23)

3.2.1. Normalwerte: 120 - 260 mg %

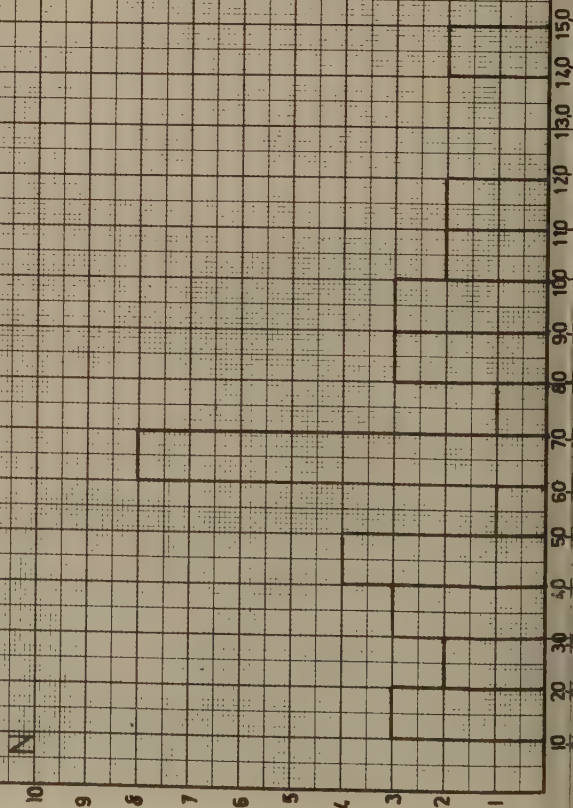
3.2.2. Werte der Proben: 265 - 770 mg %

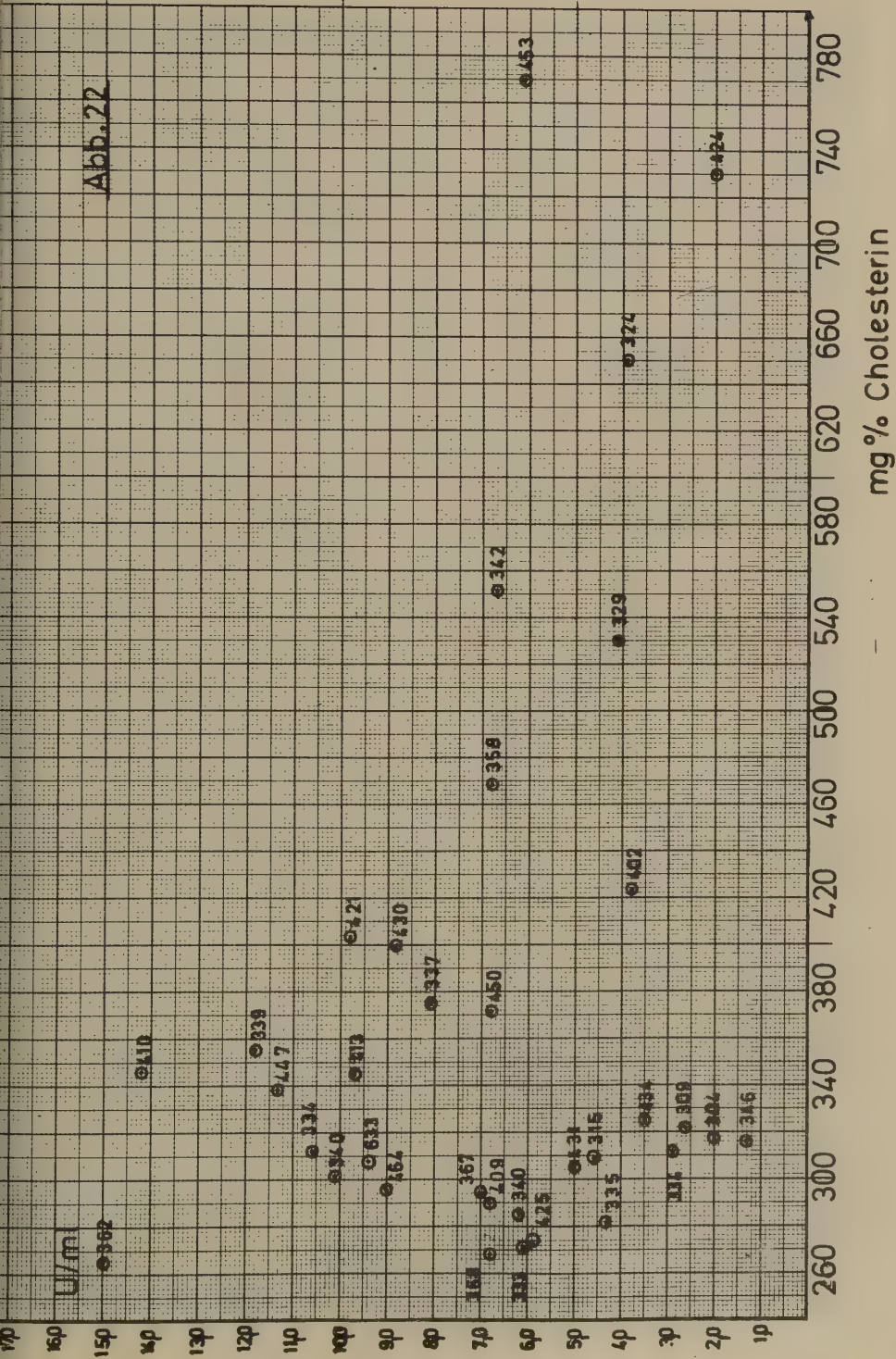
3.2.3. gefundene Enzymaktivitäten:

2,0 - 15,0 U/ml Serum

Abb. 21

CHOLESTERIN





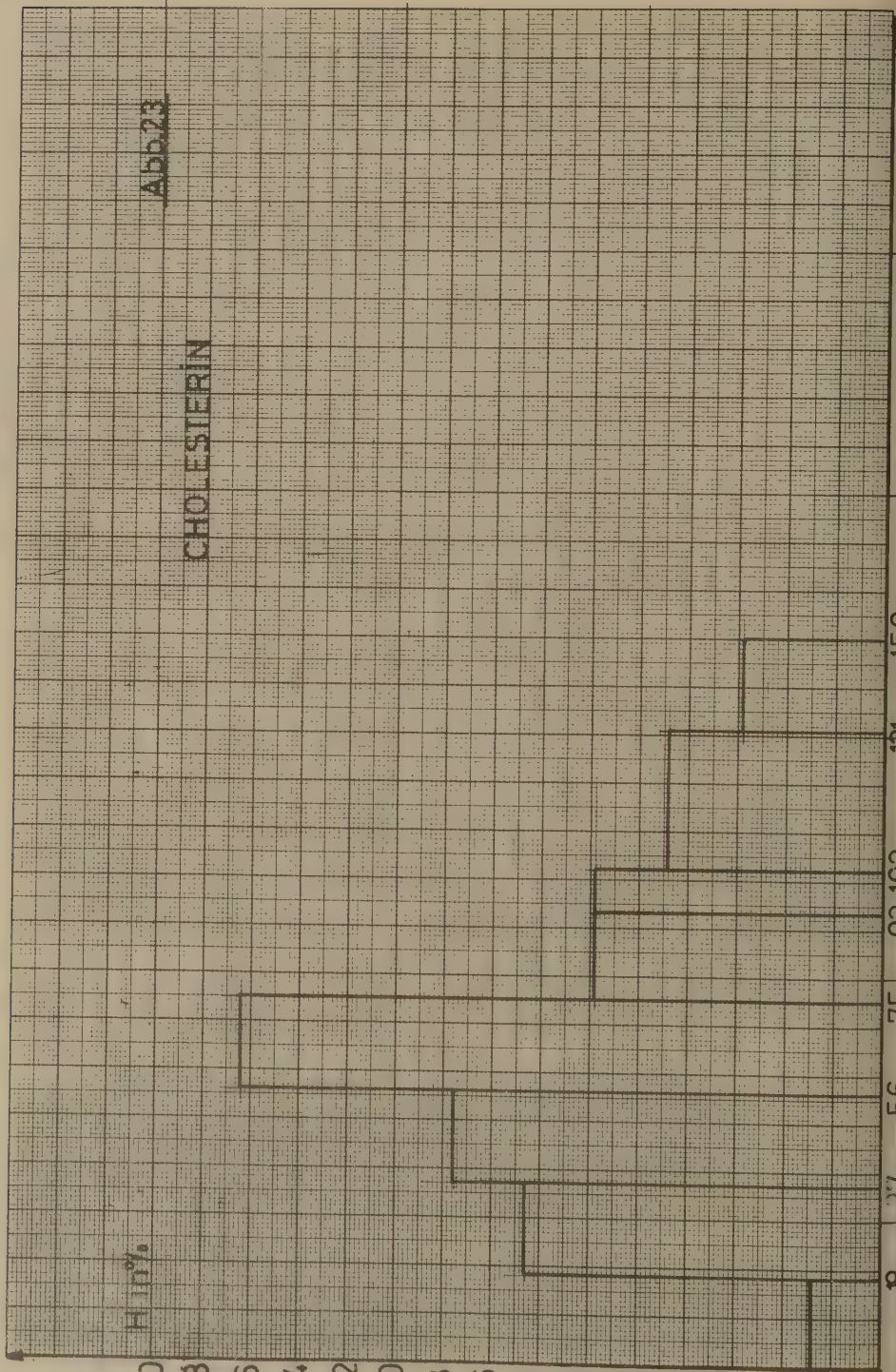
H₁₀%

Abb. 23

CHOLESTERIN

30
28
26
24
22
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2

18 37 56 75 93 102 121 150



3.3. Gesamtbilirubin (Abb. 24, 25, 26)

3.3.1. Normalwerte: 0 - 1 mg %

3.3.2. Werte der Proben: 1,4 - 31,2 mg %

3.3.3. gefundene Enzymaktivitäten:

0,1 - 13,4 U/ml Serum

Abb. 24

GESAMTBILIRUBIN

N

9
8
7
6
5
4
3
2
1

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130 140 150

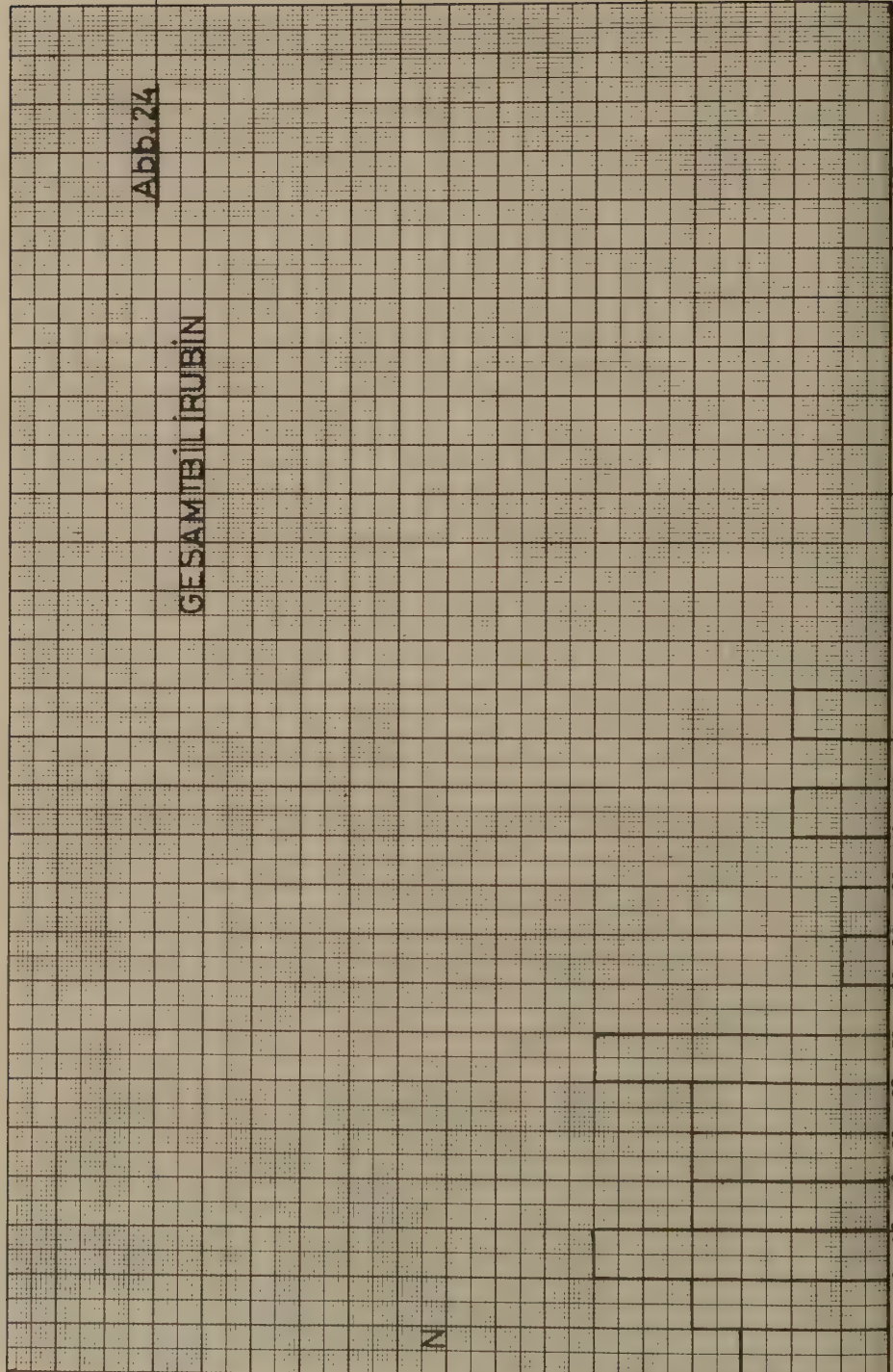
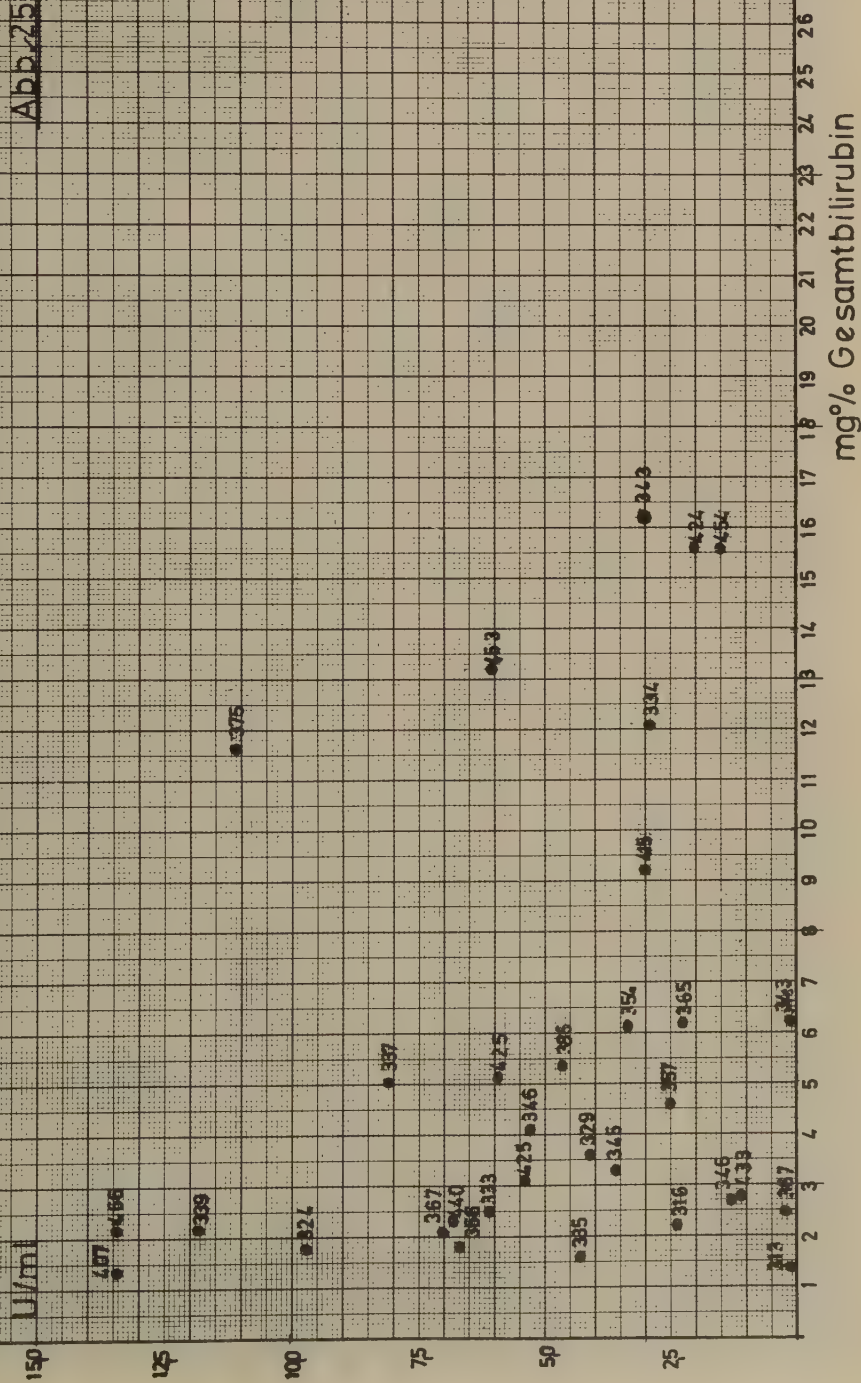


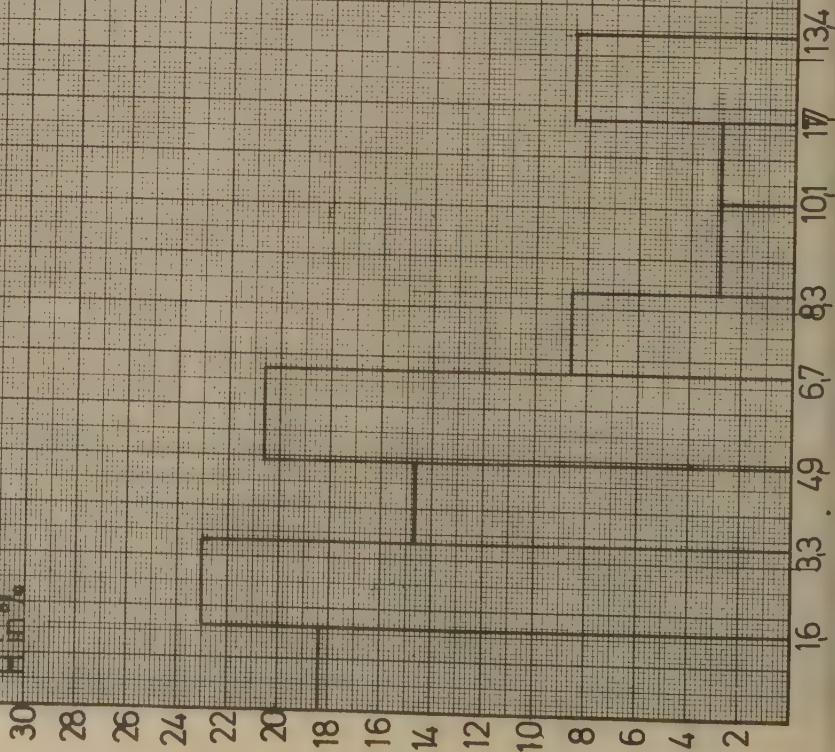
Abb. 25



Hin %

Abb. 26

GESAMTBILIRUBIN



3.4. Triglyceride (Abb. 27, 28, 29)

3.4.1. Normalwerte: 80 - 200 mg %

3.4.2. Werte der Proben: 225 - 410 mg %

3.4.3. gefundene Enzymaktivitäten:

1,2 - 15,0 U/ml Serum

Abb. 27

TRIGLYCERIDE

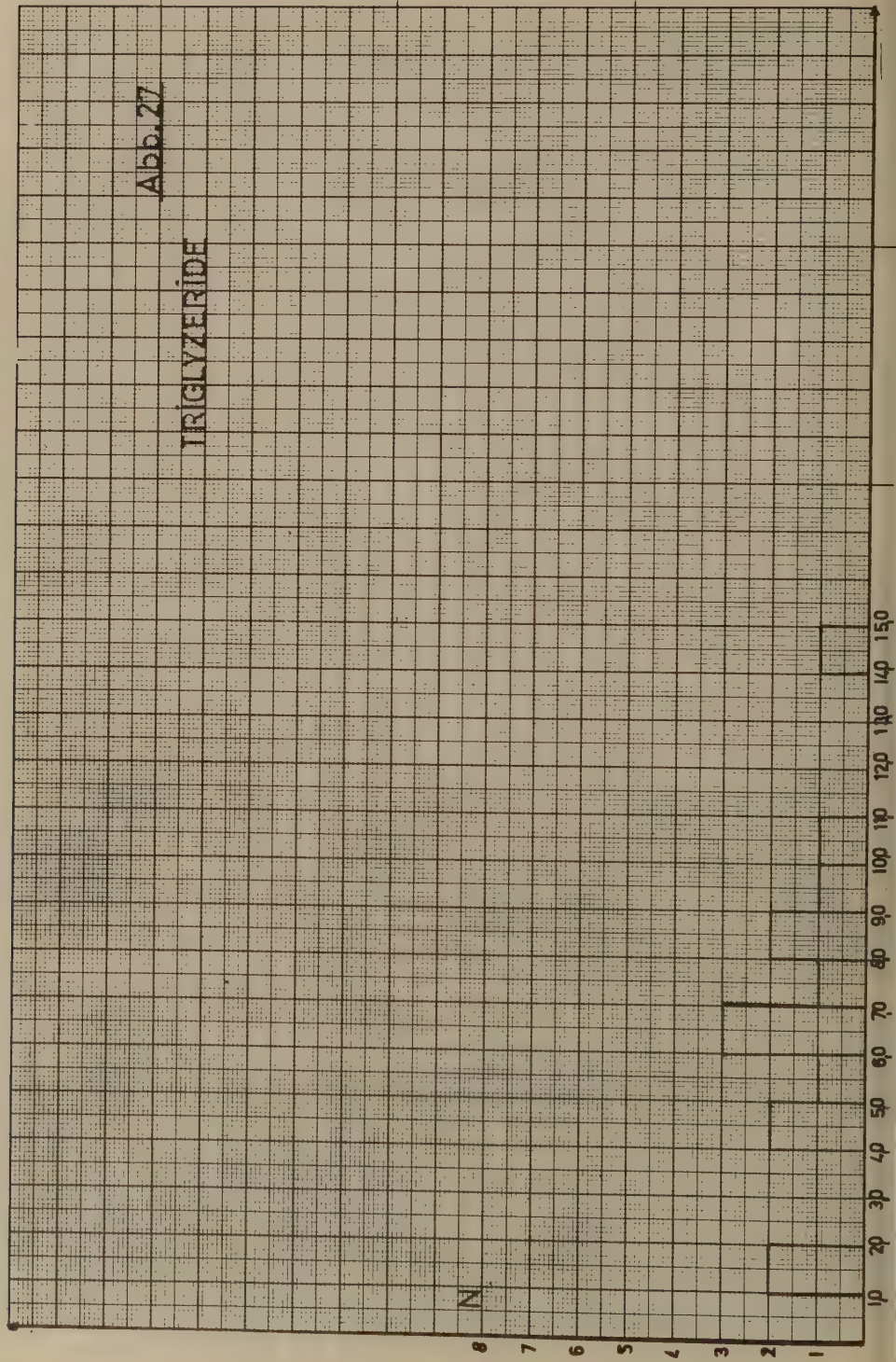


Abb. 28

0.242

U/ml

mg% Triglyzeride

150
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10

200 240 280 320 360 400 440 480 520

0.334

0.536

0.461

0.357

0.368

0.150

0.353

0.340

0.335

0.451

0.418

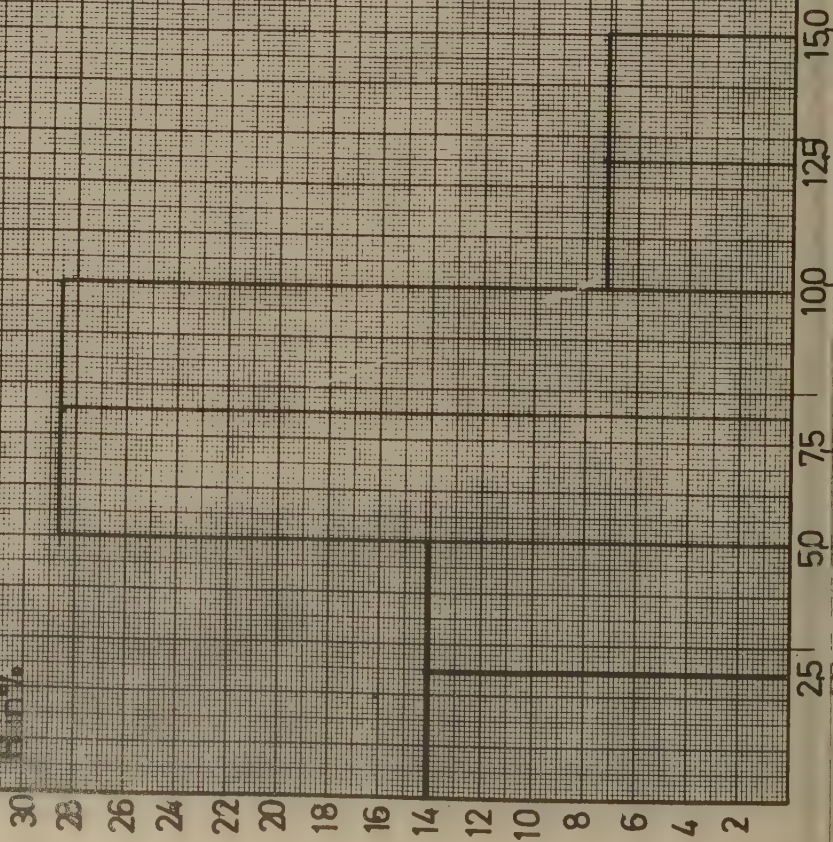
0.340

0.771

Hzm².

Abb. 23

TRIGLYZERIDE



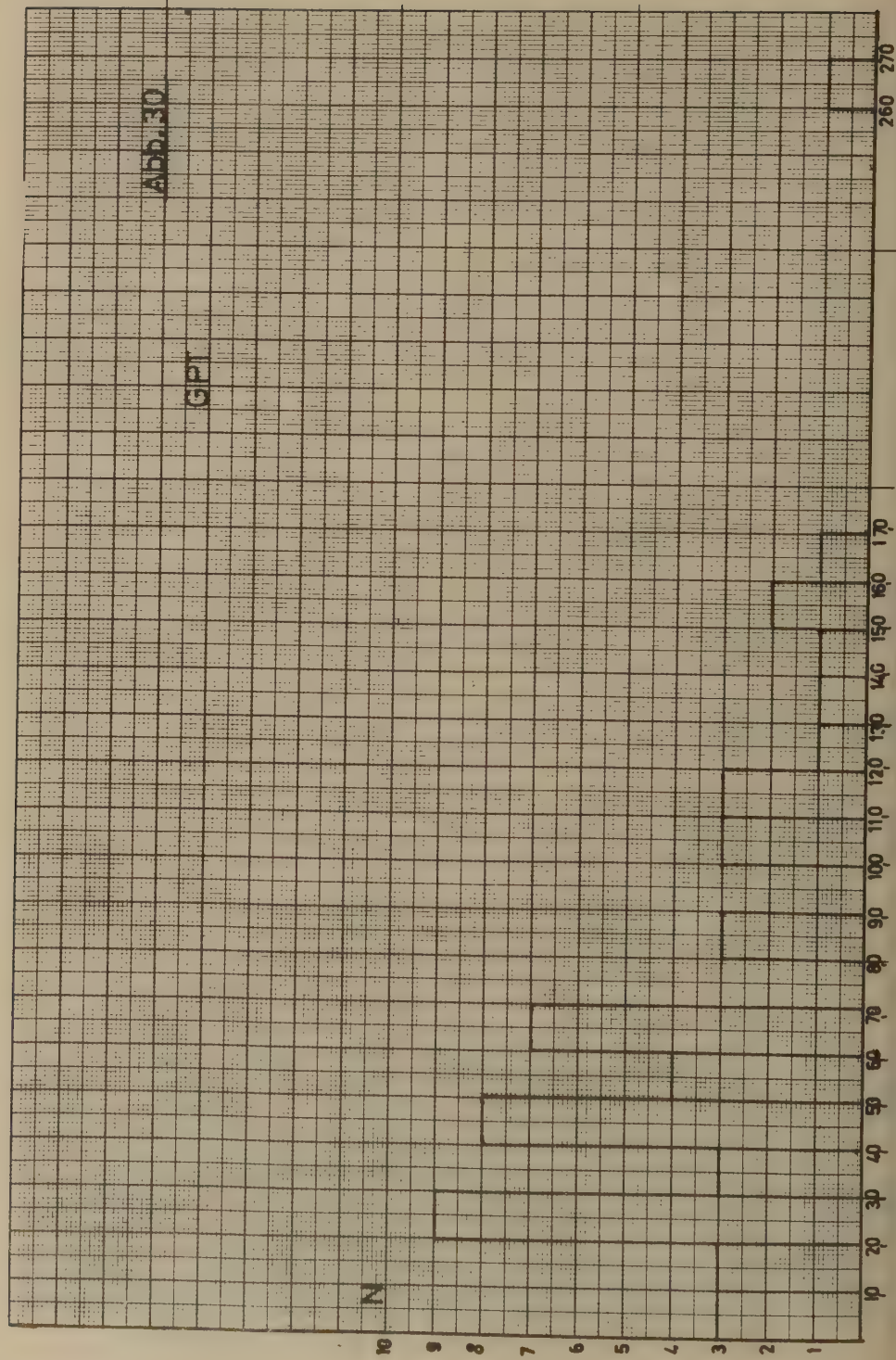
3.5. G P T (Abb. 30, 31, 32)

3.5.1. Normalwerte: 2 - 12 mU/ml (25° C)

3.5.2. Werte der Proben: 13 - 450 mU/ml

3.5.3. gefundene Enzymaktivitäten:

0,1 - 26,7 U/ml Serum



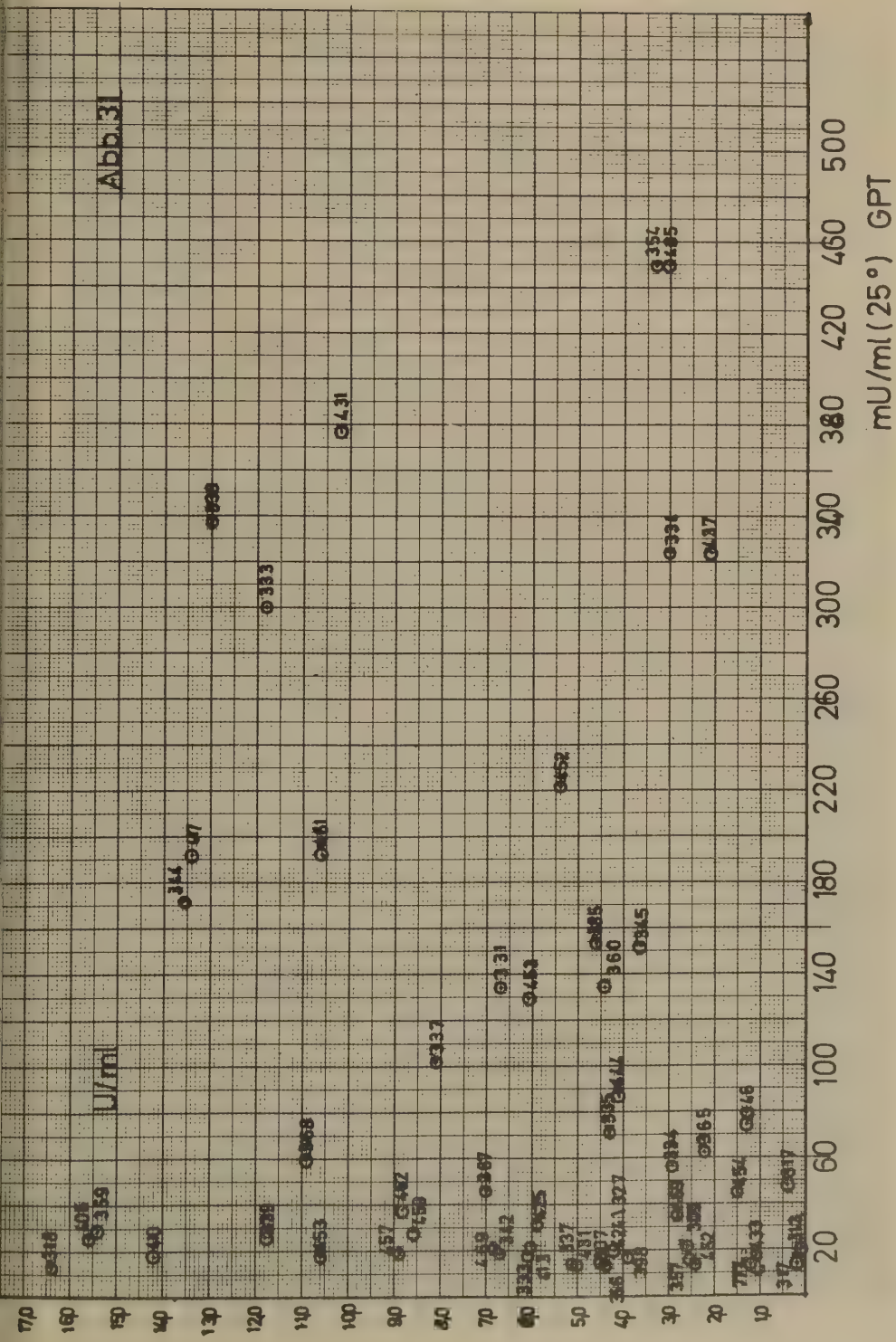


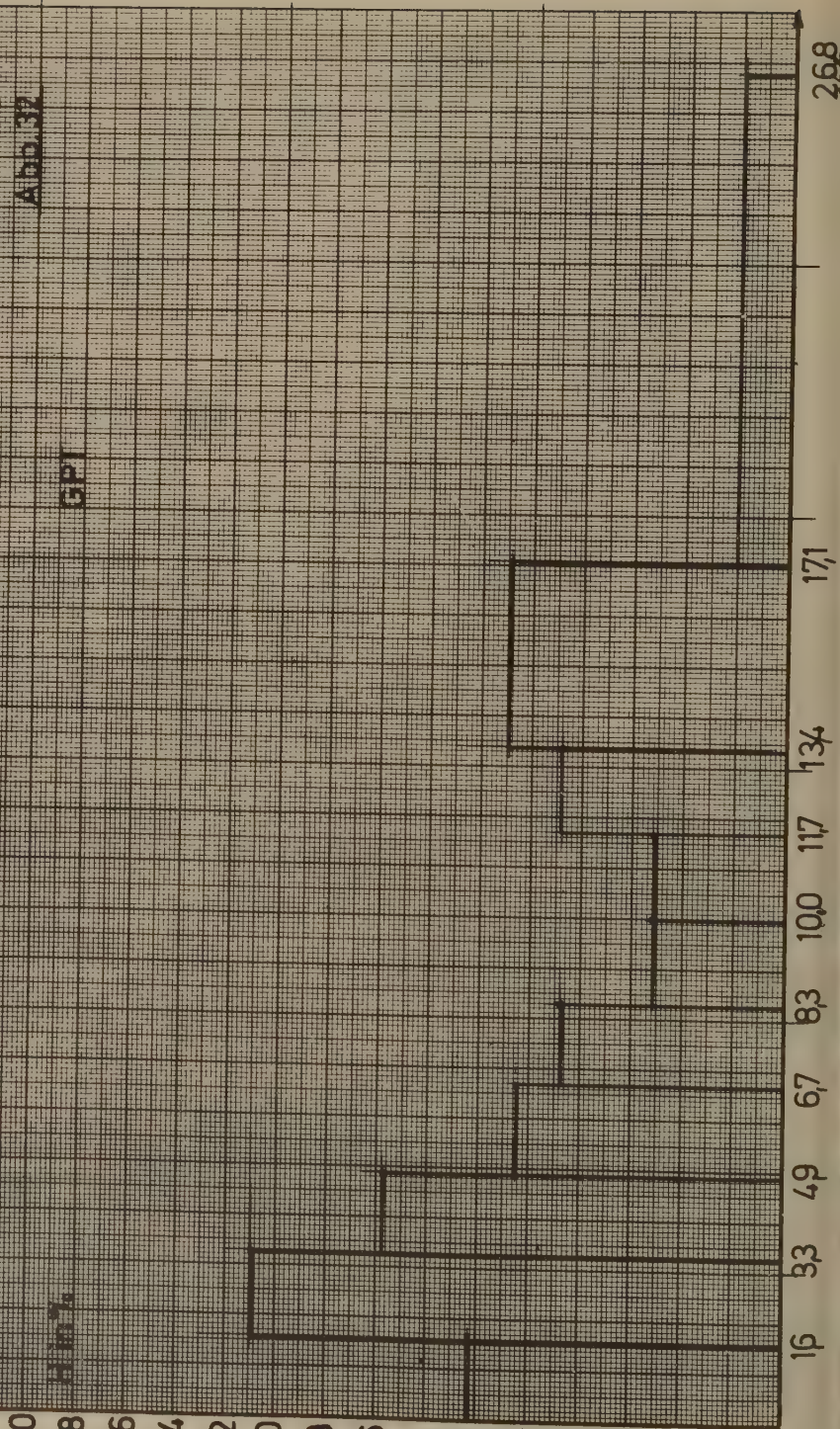
Abb. 37

GPI

H in %

30
28
26
24
22
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2

15 33 49 67 83 100 117 134 171 268



3.6. Gamma - G T (Abb. 33, 34, 35)

3.6.1. Normalwerte: 3 - 15 mU/ml bei Frauen
4 - 25 mU/ml bei Männern

3.6.2. Werte der Proben: 30 - 993 mU/ml

3.6.3. gefundene Enzymaktivitäten:
0,1 - 26,7 U/ml Serum

Abb. 33

GAMMA - GI

N

10

9

8

7

6

5

4

3

2

1

10

20

30

40

50

60

70

80

90

100

110

120

130

140

150

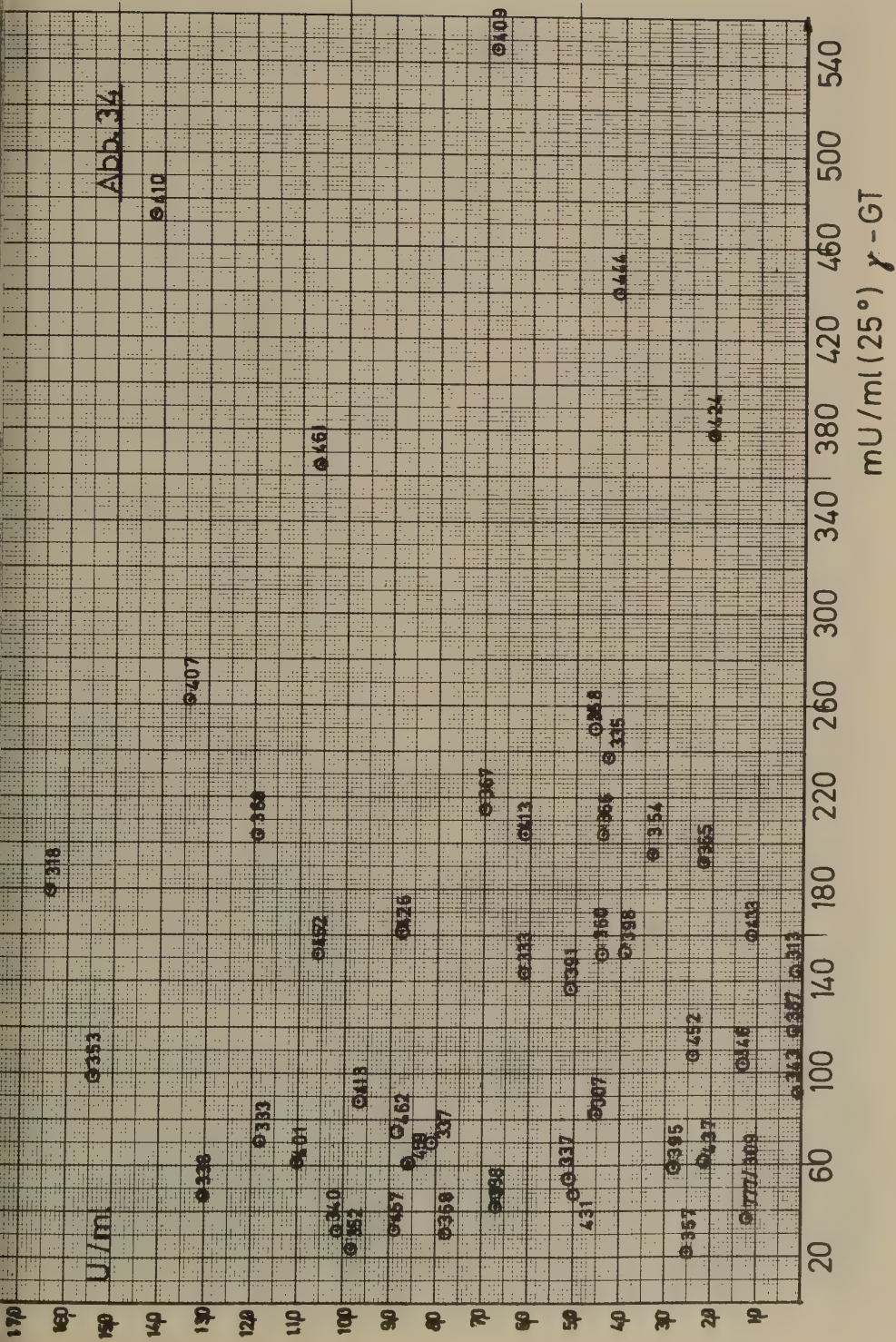
160

170

180

260

270



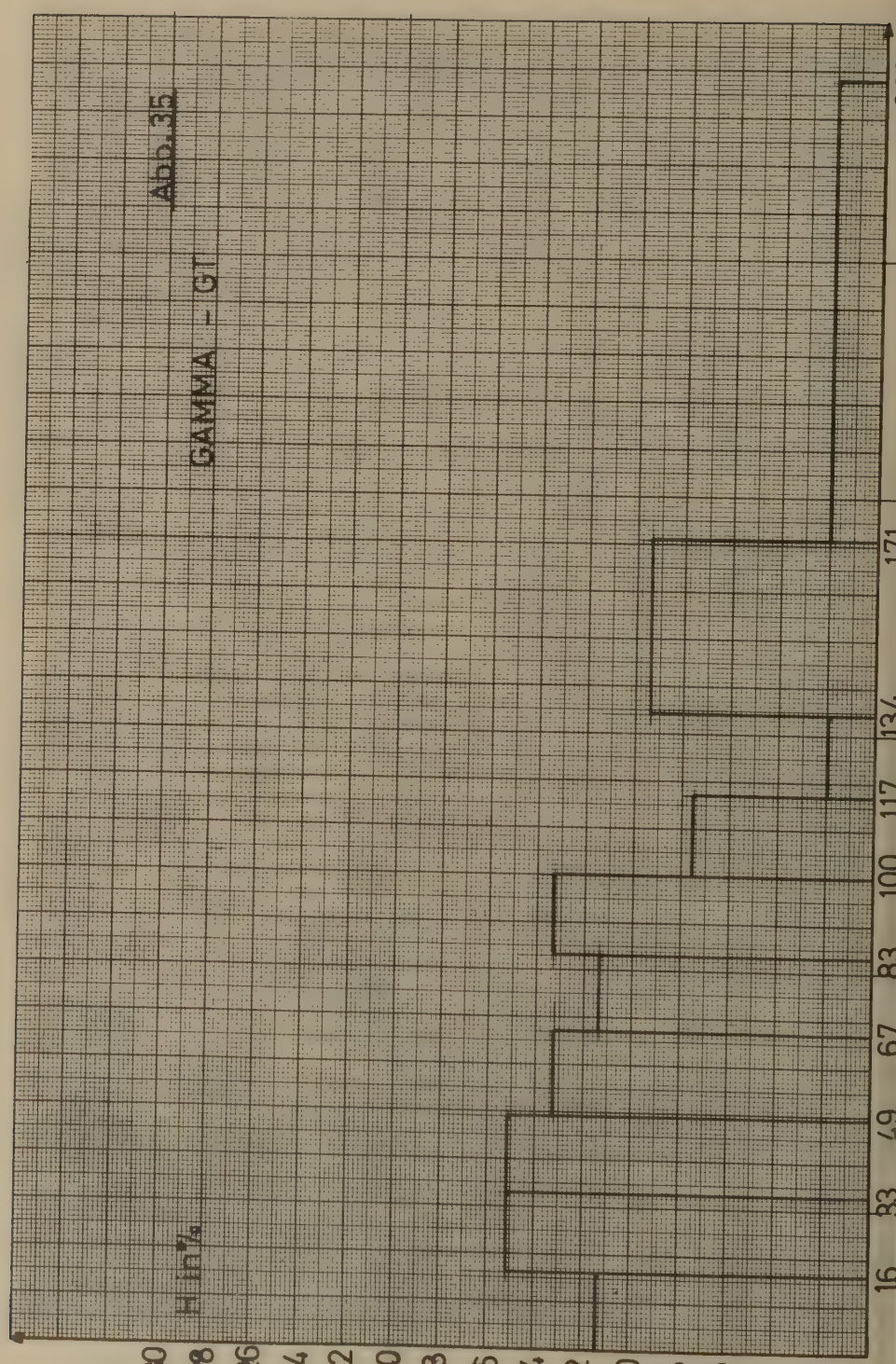
App. 35

GAMMA - GT

H in %

30
28
26
24
22
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2

16 83 49 67 83 100 117 134 171 268



4.) Synopsis der Krankengruppen

Um einen Vergleich über das Gesundenkollektiv und die 6 untersuchten Krankengruppen zu erhalten, wurden diese in den folgenden beiden Graphiken nebeneinandergestellt (Abb. 36, 37)

H
H %

NORMALWERTE

TRIGLYZERIDE

CHOLESTERIN

HARNSTOFF

0 54 109 164 218

0 54 109 150

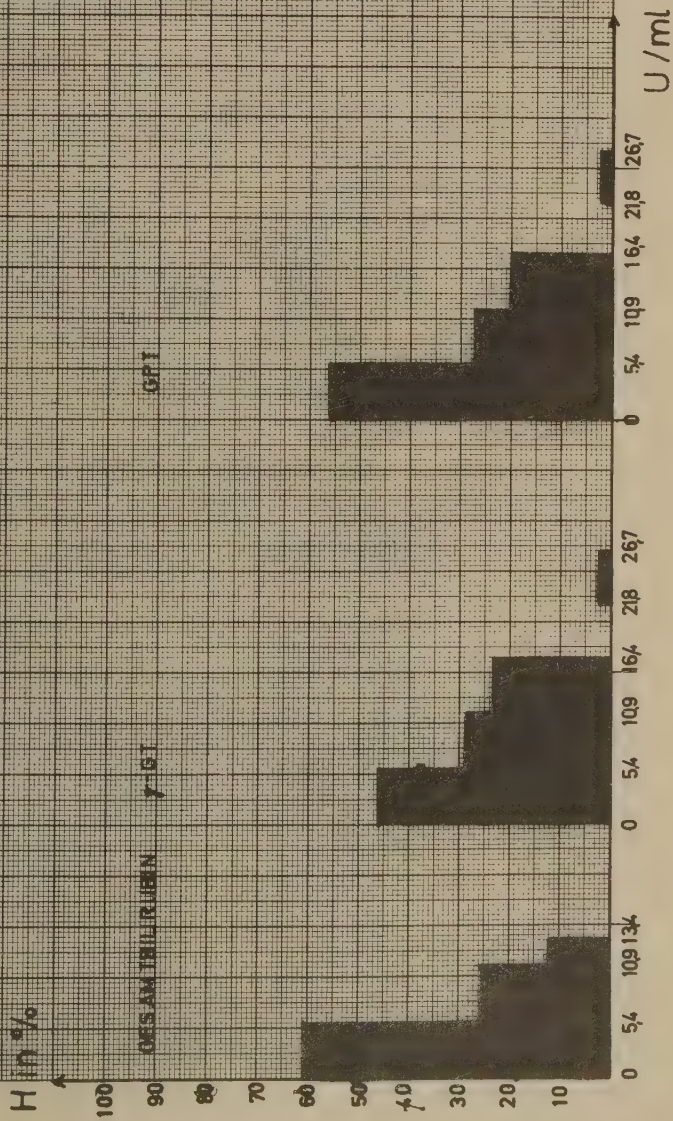
0 54 109 150

0 54 109 113

11/m



A



Alle 7 Kollektive sind in gleichgroße Aktivitätsgruppen unterteilt und gegen die jeweilige prozentuale Häufigkeit (H) der Gruppen aufgetragen.

Durch diese Darstellungsart teilen sich die 7 Kollektive in 2 Gruppen von verschiedener Häufigkeitsverteilung auf.

4.1. Die erste Gruppe erfasst

Normalwerte
Cholesterin
Triglyceride

Hier liegt die Masse der Werte im Aktivitätsbereich von 5,4 - 10,9 U/ml Serum.
Nach einem mäßig steilen Anstieg der Wertmenge erfolgt ein rascher Abfall nach dem Häufigkeitsgipfel.

4.2. In der zweiten Gruppe befinden sich

Harnstoff
Gesamtbilirubin
GPT
Gamma-GT

Hier liegt die Masse der Werte im unteren Aktivitätsbereich von 0 - 5,4 U/ml Serum.
Der Abfall der Häufigkeiten nach oben erfolgt verzögerter als bei der ersten Gruppe.

5.) Statistische Auswertung^x

5.1. Für die 7 Kollektive wurden der arithmetische Mittelwert, die Varianz und die Standardabweichung errechnet und nebeneinandergestellt:

Tabelle 19:

	Mittelwert	n	Varianz	Standardabweichung
Normalwerte	7,63	18	22,39	4,73
Gamma - GT	6,8996	54	26,38	5,136
GPT	6,514	57	26,383	5,1364
Triglyzeride	7,057	14	12,576	3,564
Gesamtbilirubin	4,9911	34	13,211	3,6347
Cholesterin	6,9205	34	11,6016	3,4061
Harnstoff	5,6000	28	8,3088	2,882

^xDie statistische Auswertung erfolgte mit der freundlichen Hilfe von Herrn Professor Dr. J. Dudeck aus dem Institut für Medizinische Statistik und Dokumentation der Justus Liebig-Universität Gießen.

5.2. Varianzanalyse

Um eine Varianzanalyse vornehmen zu können, wurde eine Neugliederung der Meßwerte aller 7 Gruppen vorgenommen. Daraus wurden folgende 6 Gruppen neu gebildet:

Tabelle 20:

	n	$\bar{x}$	s
1. Cholesterin + Triglyzeride	14	7,7214	3,4953
2. Gesamtbilirubin	9	6,9222	3,8277
3. GPT + Gamma-GT	27	8,2629	5,8250
4. Harnstoff	18	5,1666	2,8588
5. GPT + Gamma-GT + Gesamtbilir.	10	3,0500	4,0058
6. Kontrollgruppe aus Normalseren	19	7,3600	4,7300

Dabei wurde die Bedingung erfüllt, daß jeder Meßwert nur einmal in einer der 6 Gruppen auftreten darf. Bei der einfachen Varianzanalyse ungleicher Gruppengröße erfolgt nun ein Vergleich der Mittelwerte untereinander. Für jedes vergleichene Paar wurde das Konfidenzintervall nach Schaffée gebildet:

Formel 9:

$$C = 5 \cdot 2,3 \cdot 20,288 \cdot \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)$$

Ein gesicherter Mittelwertsunterschied besteht nur, wenn der Mittelwertsunterschied größer als das Konfidenzintervall ist. Die Berechnungen wurden mit logarithmierten Werten durchgeführt. Für die Varianzanalyse ergab sich folgendes Ergebnis:

Tabelle 21:

	SAQ	f	MAQ	F - Wert
zw. Gr.	4,7406	5	0,9481	6,9903
in. Gr.	12,3426	91	0,1356	
Summe	17,0832	96		

zw. Gr. = zwischen den Gruppen

in. Gr. = innerhalb der Gruppen

SAQ = Summe der Abweichungsquadrate

f = Freiheitsgrade

MAQ = Summe der mittleren Abweichungsquadrate

F - Wert = Signifikanzschranke

Folgende Tabelle zeigt in logarithmierten Werten die Gegenüberstellungen der einzelnen Mittelwertsvergleiche und deren Konfidenzintervalle.

x	$\lg x (x_a - x_b)$	$\lg x C$
1 - 2	0,0613	0,20156909
1 - 3	0,0336	0,15537864
1 - 4	0,2002	0,16812024
1 - 5	0,7582	0,19533807
1 - 6	0,0327	0,16617338
2 - 3	0,0277	0,18159062
2 - 4	0,1389	0,19260594
2 - 5	0,6969	0,21677083
2 - 6	0,0286	0,19090893
3 - 4	0,1666	0,14355999
3 - 5	0,7246	0,17464826
3 - 6	0,0009	0,14127507
4 - 5	0,5580	0,18607501
4 - 6	0,1675	0,15517905
5 - 6	0,7255	0,18431789

C = Konfidenzintervall

6.) Diskussion

Bei der Gruppe 5 (schwere Lebererkrankungen) liegt der Mittelwert deutlich niedriger als bei allen anderen Gruppen. Hier kommt das Enzym Beta-Propiolactonhydrolase vermindert vor.

Auch bei der Gruppe 4 (Harnstoff) ist ein Abfall gegenüber den anderen Gruppen erkennbar. Sonst besteht kein Unterschied zur Kontrollgruppe.

Bei der Gruppe 5 handelt es sich um Patienten mit schweren Lebererkrankungen, bei denen die Werte für GPT, Gamma-GT und Gesamtbilirubin pathologisch erhöht sind. Es ergeben sich daraus folgende Fragestellungen:

1. Wird das Enzym in der Leber gebildet?
2. wenn ja, ist die Bildung bei Lebererkrankungen gestört?
3. oder aber ist sein Nachweis in Gegenwart anderer pathologischer Serumbestandteile gestört?

Die Abklärung dieser Fragen bedürfte noch weiterer Untersuchungen.

Z U S A M M E N F A S S U N G

Für das Enzym Beta-Propiolactonhydrolase wurden untersucht:

1. Die möglichen Substrate des Enzyms
2. Sein Vorkommen im Serum Gesunder
3. Veränderungen seiner Aktivität in den Seren mehrerer Gruppen Kranker

Die Substrate

D - Glucuronsäure - Gamma - Lacton
L - Ascorbinsäure
Beta-Propiolacton
Cumarin

werden in absteigender Reihenfolge hydrolysiert.
Nicht hydrolysiert werden

Marcumar
D - Galactonolacton
D - Gluconolacton
Kavain

Innerhalb einer Gruppe von Gesunden ergaben sich keine Aktivitätsunterschiede des Enzyms bezüglich Alter und Geschlecht.

Bei Patienten mit schweren Lebererkrankungen (erhöhte Werte für GPT, Gamma-GT und Gesamtbilirubin)

und mit

erhöhten Harnstoffwerten kommt das Enzym im Serum vermindert vor.

Drei Gruppen mit pathologischen Serumwerten für

Cholesterin + Triglyceride

Gesamtbilirubin

GPT + Gamma-GT

zeigen keine signifikanten Abweichungen in ihren
Enzymaktivitäten gegenüber der Kontrollgruppe
aus Normalseren.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1.) FLORKIN, Marcel and Elmer H. STOTZ
Enzyme Nomenclature aus
Comprehensive Biochemistry 13: 128
- 2.) DUTTON, Geoffrey J.
Glucuronic Acid, Free and Combined
Academic Press, London and New York 1966
- 3.) EISENBERG, F. Jr., and James B. FIELD
The Enzymatic Hydrolysis of Glucuronolactone
Journal of the Biological Chemistry 222: 293 (1956)
- 4.) UL-HASSAN, M. and Albert L. LEHNINGER
Enzymatic Formation of Ascorbic Acid in Rat Liver
Extracts
Journal of the Biological Chemistry 223: 123 (1956)
- 5.) WINKELMANN, J. and Albert L. LEHNINGER
Aldono- and Uronolactonases of Animal Tissues
Journal of the Biological Chemistry 233: 794 (1958)
- 6.) STEPHAN, W.
Über die Hydrolyse von Beta-Propiolacton in
Seren und Plasmen
Zeitschrift für klinische Chemie und Klinische
Biochemie 7: 518 (1969)
- 7.) ROSSOW, Gisela
Beta-Propiolactonhydrolyse in Wasser und Serum
Dissertation, Giessen (1969)

8.) FELIX, K.

Versuche von A. J. Lehninger und Mitarbeitern
über die Bildung von Ascorbinsäure
8. Colloquium der Gesellschaft für physiolo-
gische Chemie am 2.-4. Mai 1957 in Mosbach/Baden.

9.) MANO, Y.

Enzymatic Studies on TPN L-Hexonate Dehydrogenase
from Rat Liver
Journal of Biochemistry (Tokio) 49: 618 (1961)

10.) KAWADA, M.

Comparative Studies on Soluble Lactonases
Journal of Biochemistry (Tokio) 51: 405 (1962)

Nach Beendigung dieser Arbeit gilt mein Dank besonders Herrn Professor Dr. L. Róka, der mir gegenüber immer sehr viel Geduld und Verständnis aufbrachte.

Herrn Professor Dr. Dudeck danke ich für die freundliche Unterstützung bei der Lösung der statistischen Auswertung.

LEBENS LAUF

Am 11. November 1947 wurde ich in Allmendfeld als Sohn des Justizbeamten Rudolf Becker und seiner Ehefrau Ruth geboren.

Ich besuchte die Grundschule in Allmendfeld sowie die Gymnasien in Gernsheim und Groß-Gerau. Nach dem Abitur im Herbst 1966 begann ich im Sommersemester 1967 das Medizinstudium in Giessen.

Dabei legte ich im April 1968 die naturwissenschaftliche - und im Juli 1969 die ärztliche Vorprüfung ab.

Die ärztliche Prüfung bestand ich am 9. Juli 1974 in Giessen.

Rudolf Becker

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die in der medizinischen Fakultät Giessen zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

Das Enzym β -Propionolactonhydrolyase:

Substrate und Vorkommen
im Serum bei Gesunden
und Kranken

im klinisch-chemischen Institut der Justus Liebig-Universität Giessen unter Leitung von Herrn Professor Dr. L. Róka ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen Hilfsmittel als die in der Dissertation angeführten benutzt habe.

Bisher habe ich weder an einer in- oder ausländischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Giessen, den 13. 1. 72

Wolfgang Becker

